

**EVALUACIÓN DEL SEMEN CANINO, SOMETIDO A CONGELACIÓN CON
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL COMO
CRIOPROTECTOR**

**MARIA ELENA ARANGO RODRIGUEZ
LAURA RENDON ALVAREZ**

Asesores:

Rubén Dario Uribe Valderrama.
Medico Veterinario Universidad De La Salle, MSc UACH
Carlos Mauricio Acevedo Naranjo
Medico Veterinario Universidad De Antioquia, MSc (C)

**UNIVERSIDAD CES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA
MEDELLIN
2009**

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	8
2. RESUMEN.....	10
3. ABSTRACT.....	11
4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	12
4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4.2 JUSTIFICACIÓN	13
4.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
5. MARCO TEÓRICO.....	15
5.1. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO CANINO	15
5.2 TÉCNICAS PARA LA TOMA DE MUESTRA SEMINAL	19
5.2.1 Toma de muestra seminal mediante el uso de una perra señuelo	19
5.2.2 Manipulación manual.....	20
5.2.3 Motivos de fracaso en la obtención de una muestra de semen.	21
5.3 VALORACIÓN Y EVALUACIÓN SEMINAL	22
5.3.1 Estudio macroscópico del semen	23
5.3.2 Valoración microscópica del semen.....	24
5.4 DEFECTOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE LOS ESPERMATOZOIDES EN EL PERRO.....	28
5.5 CITOLOGÍA.....	28
5.6 FACTORES QUE AFECTAN LAS CARACTERISTICAS DEL SEMEN	29
5.6.1 Pubertad.	29
5.6.2 Frecuencia de la eyaculación	29
5.6.3 Tamaño testicular	30
5.7 VALORACIÓN FINAL DEL SEMEN	30
5.7.1 Principales parámetros para valorar la fertilidad	31
5.7.2 Parámetros adicionales.....	31
5.8 PROCESO DE CRIOPRESERVACION SEMINAL.....	31
5.8.1 Criopreservación de semen canino.....	34
5.8.2 Crioprotectores y diluyentes	35
5.8.3 El glicerol como criopreservante	36
5.9 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA POS DESCONGELACIÓN.....	37
6. HIPÓTESIS.....	41
7. OBJETIVOS	42
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	42
7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	42
8. DISEÑO METODOLÓGICO.....	43
8.1 ENFOQUE METODOLÓGICO Y TIPO DE ESTUDIO.....	43
8.2 ANIMALES	43
8.3 DISEÑO MUESTRAL	43
8.4 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES	46
8.4.1 Diagrama de variables.....	46

8.5 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	48
8.6 CONTROL DE ERRORES Y SEVGOS.....	48
8.7 TECNICA DE PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS.....	49
8.8 PLAN DE DIVULGACIÓN DE RESULTADOS.....	50
9. CONSIDERACIONES ÉTICAS	50
10. RESULTADOS.....	51
11. DISCUSIÓN	55
12. CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	61
13. ANEXOS.....	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Parámetros de fecundidad.....	31
Tabla 2.	Parámetros espermáticos adicionales.....	31
Tabla 3.	Parámetros para establecer la viabilidad del semen para procesos de congelación.	44
Tabla 4.	Composición de los diluyentes utilizados para el proceso de congelación.	45
Tabla 5.	Determinación de las variables evaluadas en los procesos de criopreservación seminal.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Figura 1.	Funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y hormonas relacionadas	16
Figura 2.	Proceso de espermatogénesis.....	17
Figura 3.	Cámara de Neubauer, determinación de la concentración espermática.....	26
Figura 4.	Formato de evaluación seminal.....	47
Figura 5.	Determinación de la vitalidad en los tratamientos evaluados.....	52
Figura 6.	Determinación de la movilidad en los tratamientos evaluados.....	53
Figura 7.	Determinación de la concentración en los tratamientos evaluados.....	54

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores y asesores de este proyecto agradecemos a las siguientes personas quienes hicieron posible la realización del mismo.

- Dr. Carlos Giraldo, por su apoyo en la escritura del proyecto y acompañamiento inicial.
- Dr. Oscar Saenz, por haber realizado el estudio estadístico y haber direccionado la parte de discusión y resultados
- Arley Caraballo y Gloria Londoño, por habernos acompañado en el procesamiento de las muestras y orientación en el laboratorio del Instituto de Medicina Tropical
- Edvar Zapata, Coordinador canino Miro Seguridad y Dr. Julian A. Orozco, por facilitarnos los ejemplares para la toma de muestra seminal y apoyarnos con el manejo de los mismos
- Comité de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, por el apoyo económico brindado, para la consecución de equipos y materiales que hicieron posible, finalmente la ejecución del proyecto

2. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de glicerol sobre el semen canino, sometido a procesos de criopreservación; para esto se obtuvo por medio de manipulación manual 12 muestras de sémenes de machos clínicamente sanos y sometidos a las mismas condiciones de manejo. Cada muestra se dividió en cuatro tratamientos (T1: control, T2: 4%, T3: 6% y T4: 12% de glicerol). A cada eyaculado se le evaluó el volumen, pH, movilidad, concentración, morfología y vitalidad para luego ser diluidos y congelados con glicerol al 4%, 6% y al 12% de glicerol respectivamente. Luego en el análisis pos descongelación se determinaron las diferencias seminales y se estableció su relación con la concentración del crioprotector. De los resultados obtenidos en este proyecto se encontraron diferencias significativas entre las variables morfología, vitalidad y contracción, igualmente se hallaron que los tratamientos T2 y T3 proveen mejores resultados para este tipo de biotecnología.

3. ABSTRACT

The principal goal of this Project was to evaluate the effect of three different concentrations of glycerol in canine semen used in cryopreservation processes. During this Project the semen was obtained using manual manipulation. Additionally, there were 12 different samples used, each one of these samples was divided in 4 different treatments (T1: control, T2: 4%, T3: 6%, T4: 12%). In each sample the volume, Ph, motility, concentration, morphology and vitality were evaluated. Then each sample was diluted and frozen using 4%, 6% or 12% of glycerol, respectively. During the post thawing analyses the differences between the fresh semen and those used in the cryopreservation process were studied. Moreover, the relationship of these results with the glycerol concentration was determined. Finally, significant differences in the morphology, vitality and concentration were found in the research. The research also found that T2 and T3 gave better results in the cryopreservation process than T4.

4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para la preservación de semen canino en base a procesos de congelación con nitrógeno líquido, el glicerol ha sido el criopreservante mas usado en todas las especies (6, 7, 8, 10). Este criopreservante, también, es considerado un factor determinante en los resultados de esta técnica; pero, por otra parte, se ha reportado que este tiene efectos tóxicos que causan daños en la membrana celular y limitan la unión del espermatozoide al oocito (5). Con base en lo anterior es importante realizar un análisis acerca de los efectos de diferentes concentraciones de glicerol sobre los espermatozoides sometidos a procesos de congelación y descongelación.

Hasta ahora, en el país, se han realizado pocos estudios para determinar cual es la concentración adecuada de este criopreservante en el manejo de semen canino congelado con el fin de mantener un porcentaje adecuado de las características seminales, que garantice la preservación del potencial fecundante de los espermatozoides.

En la literatura se reportan diferentes falencias en la criopreservación de semen como, los cambios de sensibilidad específica de los espermatozoides ante procesos de congelación y descongelación del semen (12) y principalmente las alteraciones de membrana que disminuyen la longevidad espermática (5, 7, 8) las cuales se relacionan ampliamente con el uso de criopreservantes. En un estudio realizado en Venezuela (6), se determinó que el semen canino presenta una vida útil muy corta luego de la descongelación y por tanto bajas tasas de preñes. Por lo que se ve la necesidad de investigar y establecer técnicas que permitan mantener la calidad seminal posdesocngelación para lo cual es de gran importancia evaluar diferentes concentraciones de glicerol con el fin de identificar el valor adecuado a utilizar en los procesos de criopreservación seminal.

4.2 JUSTIFICACIÓN

La especie canina, se ha consolidado como una de las mas importantes especies de compañía para el hombre, por esta razón, el estudio de la fisiología reproductiva y de las biotecnologías usadas con fines reproductivos constituye uno de los principales puntos de estudio investigativo para el campo de la Medicina Veterinaria y Zootecnia.

El manejo de semen congelado trae grandes beneficios en el campo biotecnológico, principalmente en el área de la inseminación artificial (7). Esta técnica se ha ido consolidando como una herramienta de gran importancia para los criadores, ya que es un medio que permite realizar mejoramiento genético y de esta forma seleccionar las características deseadas en cada raza. En nuestro país esta biotecnología puede servir como método para aumentar la heterogeneidad en las diferentes razas debido a la limitada disponibilidad de reproductores con la que se cuenta hoy en día.

Los estudios realizados en el país (24, 25) no han generado datos suficientes acerca de los parámetros que se deben tener en cuenta al realizar procesos de congelamiento y conservación del semen, lo cual ha limitado el uso de esta biotecnología. Por otra parte, el avance en estas tecnologías, aumentaría la comercialización a nivel nacional e internacional de ejemplares con altas características genéticas, disminuyendo la necesidad y costos de movilización de reproductores (5); y mejorando las condiciones sanitarias para evitar el contagio de *Brucella canis*, que es una de las principal causa de infertilidad en machos a nivel mundial (13, 16, 17).

En países europeos y Estados Unidos, se han realizado estudios relacionados con procesos de criopreservación (9, 10, 11) pero no se ha comprobado su validez bajo las condiciones de nuestro país. Además en algunos países de Latinoamérica como Perú (4), Venezuela (6), Argentina (5, 7) y Brasil (8) se ha venido adelantando y profundizando este campo.

4.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del glicerol a diferentes concentraciones, como criopreservante, sobre la morfología y fisiología del semen, de doce labradores expuestos a las mismas condiciones de alimentación y ambiente, sometido a procesos de congelación y descongelación?

5. MARCO TEÓRICO

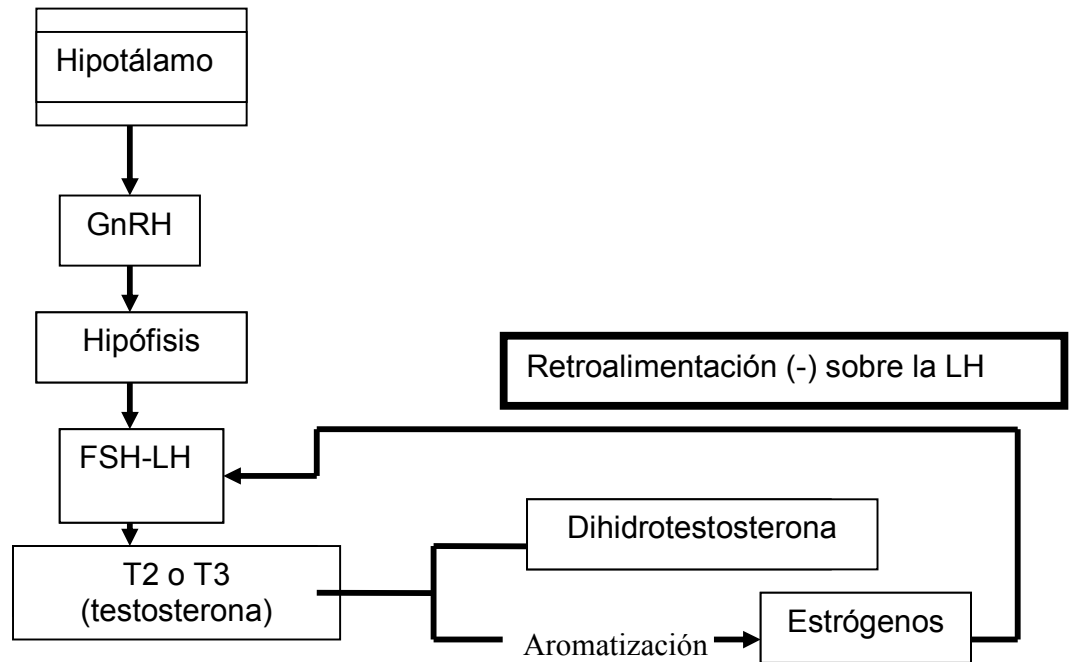
5.1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO CANINO

En los machos caninos el descenso testicular se produce a los 5 días (2) después del nacimiento, pero los testículos se encuentran completamente definidos alrededor de 15 días de edad (15).

La pubertad se alcanza en aproximadamente 9 meses, aunque este valor varía de acuerdo al tamaño y raza del ejemplar (15). La pubertad se describe como el momento en el cual el macho tiene la capacidad de copular, presenta espermatozoides en el eyaculado y son claras las características sexuales secundarias (2,15). Por otra parte la madurez sexual se alcanza 4-5 meses después de la pubertad (15).

El funcionamiento reproductivo del macho está regulado por el eje hipotálamo, hipófisis, gónadas (Figura 1). A nivel de estas últimas se produce la testosterona que es la hormona responsable de la espermatogénesis, las características sexuales secundarias, el desarrollo del aparato reproductor y el comportamiento del macho (2, 3,15).

Figura 1. Funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y hormonas relacionadas (2, 3, 15).



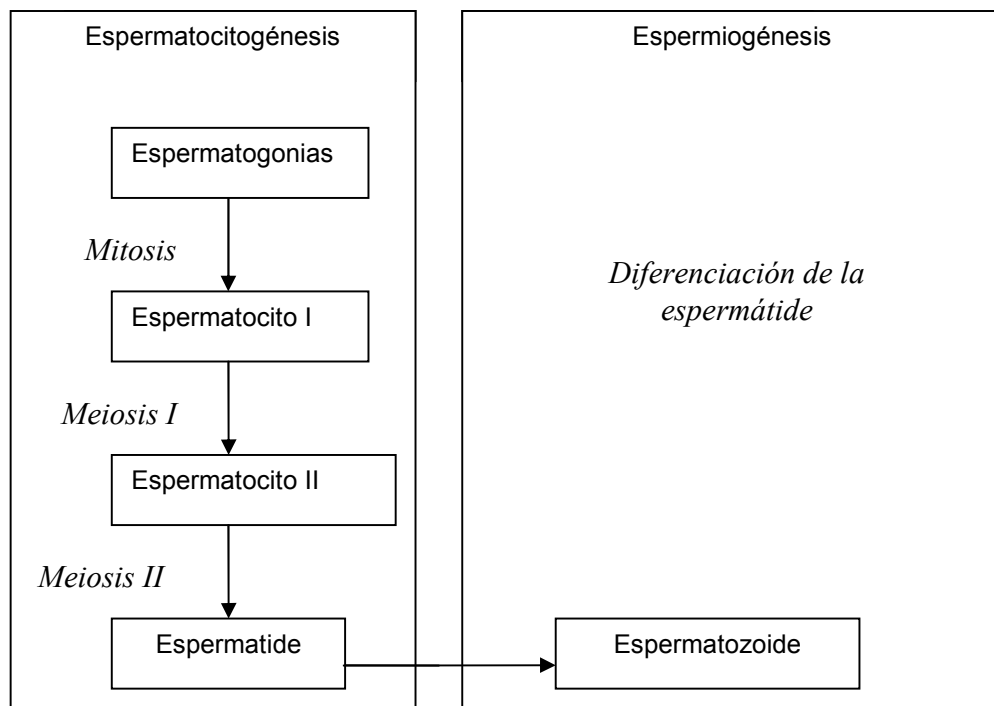
La FSH posee receptores a nivel de las células de Sertoli induciendo la expresión de la proteína ligadora de andrógenos, que aumenta la concentración de estos en los túbulos seminíferos y en el epidídimo. También, la FSH induce la producción de activina o inhibina, a nivel de las células ya mencionadas, las cuales como su nombre lo indica inhiben o activan la liberación de sí misma (15).

La espermatogénesis es un proceso que comprende dos fases (Figura 2); la primera espermatocitogénesis es el proceso por el cual se forman las espermatídes a partir de las espermatogonias; la segunda es la espermiogénesis que es el proceso de diferenciación de las espermatídes con el fin de formar espermatozoides (2).

El proceso de la espermatogénesis comienza a partir de las células germinales, que se encuentran sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos. Las células germinales

se denominan espermatogonias y se dividen en tres subtipos: la tipo A, intermedias y la tipo B (15). Las espermatogonias se dividen por mitosis hasta formar los espermatocitos primarios, los cuales, a su vez, sufren una división meiótica y se convierten en espermatocitos secundarios que experimentan una segunda meiosis, para formar así, las espermátides que son células haploides. Por último, las espermátides sufren una serie de cambios morfológicos que las llevan a convertirse en espermatozoides los cuales, finalmente, se transportan por epidídimo (2,3, 15).

Figura 2. Proceso de espermatogénesis (2, 3, 15).



La espermatogénesis se relaciona con el volumen testicular y este a su vez con el tamaño del perro, es decir, en perros de mayor tamaño la producción espermática es mayor (1, 2, 3,15).

5.1.1 Procesos de monta y fracciones espermáticas. El coito comprende desde el cortejo y la monta hasta la penetración, erección, giro de 180° y nudo (15).

El perro introduce el pene, no erecto, en la vagina por medio del hueso peneano luego se da la erección debido al bloqueo venoso y la acción del nervio pélvico (parasimpático) (15).

La eyaculación es regida por el sistema simpático que envía impulsos nerviosos a través del nervio hipogástrico. El eyaculado se divide en tres fracciones (1, 2, 15):

- Preespermática; proveniente de la próstata, con escaso volumen y de consistencia acuosa.
- Espermática; su volumen varia según el tamaño y la raza. Posee color blanco cremoso. Tiene una alta concentración espermática.
- Tercera fracción; al igual que la primera es de origen prostático y acuosa, aunque esta tiene mayor volumen y su liberación se produce una vez que esta formado el “nudo”.

5.2 TÉCNICAS PARA LA TOMA DE MUESTRA SEMINAL

La recolección de una muestra de semen puede lograrse al permitir que el macho monte a una perra en celo, mediante el uso de una hembra señuelo o por masturbación (1, 3, 6, 9). La electroyacuación requiere anestesia general y no suele utilizarse (3).

Se pueden aplicar cantidades escasas de lubricante justo dentro del borde externo de la vagina artificial sin que entre en contacto con el semen, o usar lubricantes no espermicidas. La lubricación excesiva puede ser mortal para la viabilidad espermática y debe evitarse. Se utilizan tubos de plásticos para evitar la rotura del dispositivo de recolección, que es muy probable que ocurra cuando el macho tiene impulsos pélvicos fuertes. Se utilizan guantes de vinilo, en lugar de látex para disminuir lo más posible el efecto lesivo del segundo sobre la movilidad espermática (3).

En la mayoría de las investigaciones recientes realizadas en América Latina y Estados Unidos, se reporta el método de manipulación manual como la técnica de elección para la realización de estudios seminales y recolección de semen (1, 3, 6, 9). Por otra parte el uso de una perra señuelo o hisopos impregnados de feromonas mejora la libido del perro aumentando la eficiencia en la recolección de la muestra (3,6). En la mayoría de los estudios relacionados con el tema se realiza la recolección manual acompañada del uso de una perra en calor o hisopos.

5.2.1 Toma de muestra seminal mediante el uso de una perra señuelo. La técnica más fácil para obtener una muestra de semen es dejar que el macho monte a una perra en proestro, estro, o ambos. También puede usarse una perra señuelo en anestro, aunque el interés sexual del macho es menos constante (3).

Se puede aplicar una feromona artificial, éster metílico de ácido *p*-hidroxibenzoico, a la vulva y los cuartos traseros de una perra en anestro para simular el estro (3).

Los impulsos pélvicos rápidos y la eyaculación comienzan casi de inmediato. Es necesario tener cuidado de evitar el daño al pene por forzarlo demasiado dentro de la vagina artificial. Además, conforme se inicia la eyaculación, la vagina artificial se retira poco a poco del glande (a menos que se use un cono distensible) para evitar traumatismo conforme éste crece (3).

Las primeras dos fracciones del eyaculado (preespermática: 5 a 20 segundos de duración; rica en espermatozoides: 30 segundos a 4 minutos de duración) (1, 2, 3, 5, 6, 7, 15) se obtiene durante la fase de impulsos pélvicos de cópula e inmediatamente después de ella, respectivamente. Una vez que se han eyaculado estas fracciones, el perro suele desmontar y pasar por encima de la perra y el brazo del recolector con la pata trasera, de manera que el pene gire 180° y se dirija en forma caudal. La mayor parte eyaculan líquido prostático a chorro durante varios minutos y el volumen de eyaculado depende de la duración del "enlace" (3, 15).

No es necesaria la recolección de líquido prostático para valorar la movilidad y morfología de los espermatozoides (1,2, 3, 15) ni para la inseminación artificial (1,2, 3, 15). Tan pronto como se obtienen, hay que valorar las dos primeras fracciones del semen para disminuir lo más posible los artefactos resultantes de la recolección del líquido prostático. Si se va a utilizar el semen para inseminación artificial, se recolecta suficiente líquido prostático para aumentar el volumen de la muestra (3). Se evita la obtención de líquido prostático excesivo debido al potencial de efectos deletéreos sobre la viabilidad de los espermatozoides (3).

5.2.2 Manipulación manual. Se puede recolectar el semen de la mayoría de los perros mediante la manipulación manual o digital (1, 3, 6, 8, 9, 10). La secuencia general de eventos es la misma que se mencionó; la dificultad inicial radica en la obtención de una erección (3).

Debe retraerse con suavidad el prepucio y deslizarse para cubrir el glande y la porción proximal del pene hasta que se inicie la erección. Al iniciar ésta, se retrae el prepucio sobre el glande en crecimiento y se aplica presión digital suave, en posición proximal a éste, con los dedos pulgar e índice. Si se pierde la erección durante esta secuencia de sucesos, se permite al perro descansar durante algunos minutos y se intenta una vez más el procedimiento (3).

Durante la recolección manual, la aplicación de compresión constante alrededor de la circunferencia del pene, en posición proximal al glande, mantiene la erección y permite la recolección del líquido prostático.

5.2.3 Motivos de fracaso en la obtención de una muestra de semen. Aunque hay numerosos motivos para que fracase la obtención de una muestra adecuada de semen, los más frecuentes incluyen una técnica deficiente de recolección, un macho con nerviosismo o agitación inusual, interferencia por parte del propietario y anomalías en el macho. Los errores comunes en la técnica incluyen falta de exposición del glande, momento inadecuado de exteriorización del pene, fuerza o presión excesivas sobre el pene, uso de dispositivos de recolección fríos y contacto con el pene. Con la práctica es posible resolver la mayor parte de estos problemas técnicos (3).

Otro motivo frecuente de fracaso es colocar al perro en un ambiente no familiar, como el hospital veterinario (1, 3). No es raro que los machos no muestren interés sexual, incluso ante una perra en estro, cuando se acaba de colocar en un ambiente atemorizante. Dejar al perro en un ambiente nuevo durante unas cuantas horas a menudo alivia el temor (1, 3). Cuando se intenta recolectar una muestra de semen, es necesario evitar todas las distracciones posibles. El cuarto de recolección debe estar tranquilo y contar con un piso adecuado para que el macho pueda tener tracción. Solo deben encontrarse en el cuarto aquellas personas absolutamente necesarias para la recolección. Hay que evitar aglomeraciones, la plática excesiva, las risas, las fotografías con flash. Deben estar presentes los propietarios del macho. No es raro que éste se rehúse a participar si no está presente una persona conocida. Algunos machos sólo pueden ser objeto de recolección

por sus propietarios, unos cuantos sólo en casa y un pequeño número no pueden ser objeto de recolección hasta que su propietario sale del cuarto (3).

El líbido escaso, dolor (por ejemplo, orquitis o prostatitis aguada, artritis degenerativa) o anomalías conductuales adquiridas por una experiencia sexual negativa previa, puede afectar el proceso de recolección de la muestra de semen.

5.3 VALORACIÓN Y EVALUACIÓN SEMINAL

El análisis del semen es parte integral de la valoración de posible infertilidad o subfertilidad y hay que realizarlo como parte de la exploración sistemática previa al apareamiento (3). El estudio del semen debe concluirse antes de la inseminación artificial o congelación (1, 3, 5, 7)

Ninguna característica aislada de una valoración de semen, es por sí misma, un parámetro preciso de la fertilidad. La valoración de semen es sólo uno de los muchos factores a considerar cuando se estudia a un macho. Las características del semen que parecen correlacionarse de manera mas estrecha con la fertilidad son: el número total de espermatozoides por eyaculado, el porcentaje de movilidad progresiva y la morfología espermática. (3)

También es recomendada y utilizado el cultivo del semen en perros con sospecha de prostatitis, orquitis o epididimitis (3). Puesto que normalmente hay espermatozoides vivos en el eyaculado. El médico debe manejar con cuidado el semen para evitar la muerte o cambios artificiosos en la morfología o movilidad celular por manejo erróneo de la muestra. El semen se estudia inmediatamente después de obtenerlo; cualquier retraso aumenta el número de espermatozoides muertos. Hay que evitar cambios importantes en la temperatura ambiental. En condiciones ideales, todo el equipo se mantiene cerca de los 37°C para evitar cambios extremos de temperatura. Las laminillas y dispositivos de recolección deben estar tibios, limpios y sin alcohol, polvo o lubricante excesivo (3, 9, 14).

El método para recolección de semen y el tipo y la secuencia de las técnicas analíticas utilizadas para estudiarlo deben ser constantes. En la actualidad, la mayor parte de los estudios microscópicos y macroscópicos del semen son subjetivos y llevados a cabo por un técnico calificado. Hoy en día se dispone en el mercado de equipos analizadores automatizados de espermatozoides, que se han vuelto de gran valor en la valoración del semen de las especies humana, bovina, equina y otras (3). El uso del equipo que permite la valoración objetiva del semen debe ayudar a reportar causas de infertilidad antes no apreciadas. Sin importar el método usado para valorar el semen, hay que llenar un formulario estándar y archivarlos en el expediente médico del paciente (3).

5.3.1 Estudio macroscópico del semen. Para el estudio macroscópico del semen se deben tener en cuenta los siguientes parámetros

Volumen: El volumen del semen obtenido es muy variable y depende de la edad, la talla, la frecuencia del procedimiento y la cantidad de líquido prostático recolectado del perro. El volumen normal puede variar de 1 a 40 ml por eyaculado (3). Es importante recolectar toda la fracción rica en espermatozoides (segunda) cuando se estudia el semen del perro (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14). El volumen de dicha fracción varía entre 0.5 y 12 ml. y es turbio (3,15). La tercera fracción (es decir, líquido prostático), es translúcido (1, 3,15). Una vez que el eyaculado cambia de aspecto, de turbio a claro, el recolector puede suponer que se ha obtenido la segunda fracción completa y es posible interrumpir el procedimiento. Esto suele ocurrir en los 5 minutos que siguen al término de los impulsos pélvicos. El volumen no tiene correlación con la fecundidad, a menos que el animal no eyacule. (3)

Color: Por lo general, el semen del perro es blanco a opalescente y opaco (1, 3,15). La intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides. Un semen claro e incoloro sugiere azoospermia (3). Se encuentra un tinte amarillento por contaminación con orina o pus. Una coloración verde, con o sin cúmulos, coágulos o escamas, sugiere pus o infección en el aparato reproductor. Un tinte rojo sugiere la

presencia de sangre, que suele provenir de la próstata o de un pene traumatizado y lleno. La hemorragia no necesariamente indica enfermedad (3). Algunos perros que experimentan anticipación sexual prolongada antes de que se les permita copular pueden tener hemorragia transitoria hacia el semen a partir de la próstata. A menudo puede obtenerse semen normal de estos perros si se aíslan de la perra en estro durante 12 a 24 horas y después son objeto de recolección (3). Sin embargo la recurrencia de cualquier anomalía causa preocupación y sugiere estudio adicional. En general, cualquier color anormal debe alertar al médico respecto a la posibilidad de un problema y es necesario considerar el estudio cuidadoso del aparato reproductor. Cualquier agente, por ejemplo orina, pus, sangre, que modifique el color puede afectar la concentración, la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides (3).

pH: El pH normal del semen canino va de 6.3 a 6.7 y depende en parte, de la cantidad de líquido prostático obtenido (1, 2, 3,15). Se cree que la naturaleza alcalina del líquido prostático favorece el aumento de la movilidad espermática y la neutralización del ambiente ácido de la vagina durante la cópula. Un aumento en el pH del semen se vincula con la eyaculación incompleta o inflamación de testículos, epidídimos o próstata (3).

5.3.2 Valoración microscópica del semen.

Para el estudio microscópico del semen se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

Movilidad: Se valora la movilidad de los espermatozoides tan pronto después de obtener la muestra de semen. Se coloca una gota de semen en un laminilla limpia y fijada al calor, y se observa al microscopio desde 200X hasta 400X en cuanto a movimientos de avance progresivos de espermatozoides individuales (3). El estudio de los espermatozoides bajo menor aumento puede dar la impresión de movilidad en avance, cuando de hecho hay movimiento anormal de lado a lado sin avance. La valoración progresiva hacia adelante puede ser difícil en muestras muy concentradas. Una dilución 1:1 del semen con búfer fosfato salino (PBS), permite la valoración precisa de la movilidad de espermatozoides individuales (3).

La motilidad progresiva de avance se considera normal en los espermatozoides y se cree que refleja la viabilidad y capacidad de fecundar el óvulo. Una muestra normal de semen debe tener más del 70% de los espermatozoides con motilidad vigorosa de avance (3). Se valora de manera individual a los espermatozoides en cuanto al tipo de movimiento. Aquellos que forman pequeños círculos o presentan movimientos laterales sin avance no son normales. El porcentaje de espermatozoides con movilidad activa puede modificarse por exposición del semen a extremos de temperaturas (3,9), diluyentes ácidos, agua, orina, pus, sangre o lubricantes (3). El primer eyaculado de un perro, después de un periodo prolongado de reposo sexual, puede contener un porcentaje mayor de espermatozoides viejos y muertos que se han almacenado en el epidídimo (3, 5). Esto disminuye el porcentaje de espermatozoides con movilidad activa. Las muestras de semen obtenidas en días subsiguientes deberán ser más cercanas a lo normal

Debe estudiarse una segunda muestra de semen siempre que se encuentre un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles o muertos (3). Se debe tener especial atención en las técnicas de recolección y manejo de la muestra para disminuir o eliminar los artefactos (1, 3, 5). Los guantes de látex pueden tener un efecto lesivo en la movilidad espermática y se deben evitar al recolectar una muestra de semen. Los guantes de vinilo tienen un efecto mínimo sobre la motilidad. Los problemas persistentes de motilidad espermática pueden reflejar un problema en los testículos o el epidídimo (3).

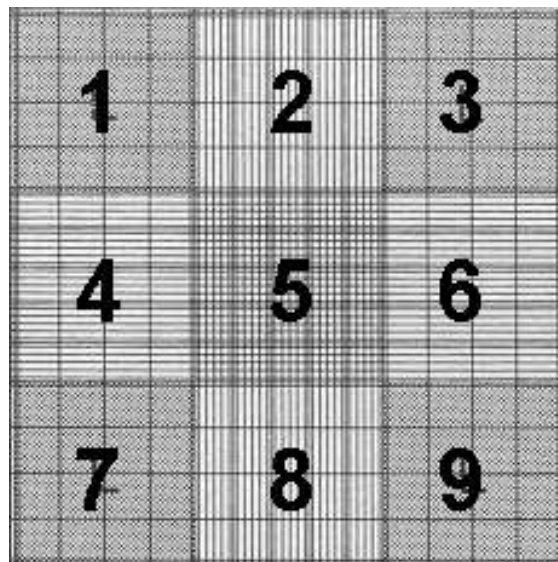
Concentración: La concentración o número de espermatozoides por eyaculado se determina al multiplicar el número de espermatozoides por mililitro de semen por el volumen total (en ml) de recolectado (3).

$$\text{Concentración espermática} = \# \text{ espermatozoides/mL} \times \text{Volumen total (mL)}$$

El volumen total de semen depende, en parte, de la cantidad de líquido prostático claro (tercera fracción del eyaculado) obtenida, lo que lo hace extremadamente variable. El estudio de la concentración de espermatozoides por mililitro es por completo impreciso (3). Los espermatozoides se pueden contabilizar con un espectrofotómetro calibrado,

cámara de Coulter o una cámara de Neubauer (hemocitómetro). El uso de un equipo de dilución de leucocitos 1/100 Unopette® y el hemocitómetro constituyen un medio relativamente rápido y económico para determinar la concentración de espermatozoides. El eyaculado se mezcla con suavidad, se llena el capilar Unopette® con semen y se combina con agua, para después colocar la mezcla en la cámara del hemocitómetro. Se calcula el número de espermatozoides en el cuadrante medio de los nueve principales (Figura 3) y el resultado se multiplica por 10^6 para obtener el número de espermatozoides por mililitro (3). Esta cifra luego se multiplica por el volumen de eyaculado para obtener el número total de espermatozoides por eyaculado, que en el perro adulto normal es de 200 millones hasta mas de 1000 millones (3,15). El número de espermatozoides por eyaculado varia dependiendo en parte, de la edad, el peso testicular, la actividad sexual y, tal vez, la estación del año. Las razas más grandes tienen una mayor concentración de espermatozoides que las pequeñas (3,15).

Figura 3. Cámara de Neubauer, determinación de la concentración espermática (21).



Se cuentan los espermatozoides presentes en 1, 3, 7 y 9. Se hace la media y el resultado obtenido es la concentración de espermática (millones/mL) (21)

Morfología: Se estudian al microscopio frotis de eyaculado sin diluir para observar anomalías estructurales de los espermatozoides. Se coloca una gota pequeña de semen fresco no diluido en una laminilla y se tapa con un cubreobjetos grande. Esto distribuye el líquido en una placa delgada y permite el estudio preciso de espermatozoides individuales sin tinción. Esta valoración se realiza mejor con microscopio de contraste (3). Como alternativa, se pueden hacer frotis de semen en una laminilla de manera similar a lo que se hace con la sangre, se sacan al aire y después se tiñen con la técnica rápida de tres pasos. También es posible teñir el frotis con tinta de la india o colorante de eosina-nigrosina (3).

La valoración de la morfología espermática se debe realizar al microscopio mediante inmersión en aceite. Se valoran los espermatozoides individuales en cuanto a anomalías que ocurren en la cabeza, la pieza media y la cola. Estas anomalías pueden subclasificarse en primarias y secundarias (3). Se cree que las primarias representan alteraciones de la espermatogénesis, es decir, dentro del testículo, en tanto que las secundarias son inespecíficas y pueden ocurrir durante el tránsito por el sistema de conductos, es decir, dentro del epidídimo, durante el manejo del semen o después de infecciones, traumatismo o fiebre. Se deben contabilizar y clasificar un mínimo de 200 espermatozoides; solo se contabilizan cabezas libres, no las colas. Los machos normales deben tener más del 70% de espermatozoides con morfología normal. Las anomalías primarias deben constituir menos del 10% y las secundarias menos del 20% de los espermatozoides defectuosos en el perro normal (3). Por desgracia, no se han estudiado las correlaciones entre porcentajes de anomalías espermáticas y tasas de concepción en perros. Sin embargo, una tasa menor del 30% de defectos totales es un criterio normal razonable en la valoración de espermatozoides caninos (3).

5.4 DEFECTOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE LOS ESPERMATOZOIDES EN EL PERRO

Anomalías primarias: dentro de estas se incluyen todos los cambios morfológicos relacionados con (3):

- Cabeza: como cabezas dobles, en pera, ahusada, microcefalismo, sin cabeza o con cabeza amorfa. (21)
- Pieza intermedia: dentro de esta se encuentran cola doblada a nivel de la pieza intermedia, pieza intermedia doble e inclusiones citoplasmáticas (21)
- Duplicación de pieza intermedia, cabeza o cola (21)
- Delgadez a nivel de cabeza, cola o pieza intermedia (21)
- Gotas citoplasmáticas proximales
- Cola: calas enrolladas o en espiral. (3, 21)

Anomalías secundarias: dentro de estas se incluyen todos los cambios morfológicos relacionados con (3):

- Cabezas o colas normales separadas
- Acrosoma separado
- Curvatura de la pieza media
- Curvatura de la cola
- Gota citoplasmática distal

5.5 CITOLOGÍA

Los frotis de semen no diluido también se tiñen con colorante de Wright o azul de metileno nuevo y se valoran en cuanto a la presencia de células inflamatorias y bacterias. No es raro encontrar una célula inflamatoria sana ocasional (es decir, neutrófilo, linfocito, macrófago, célula plasmática), eritrocito o bacteria en el semen de un perro normal como resultado de contaminación uretral del eyaculado (3). Además, son frecuentes las células epiteliales, sobre todo después de periodos prolongados de reposo sexual. Sin embargo,

se considera anormal el hallazgo de cifras elevadas de estos tipos celulares. Las bacterias intracelulares o los cambios tóxicos en los neutrófilos apoyan la presencia de infección. Sin embargo su ausencia no la descarta. La presencia de grandes grupos de eritrocitos indica hemorragia, que suele originarse en la próstata o el pene. Las cifras grandes de células mononucleares indican orquitis inmunitaria. En ésta, también pueden encontrarse neutrófilos junto con las células mono nucleares (3),

5.6 FACTORES QUE AFECTAN LAS CARACTERISTICAS DEL SEMEN

5.6.1 Pubertad. Los eyaculados iniciales de un perro después de que alcance la pubertad a menudo contienen espermatozoides anormales y muertos. En los eyaculados subsiguientes, las concentraciones de espermatozoides aumenta, el número de anormales disminuye y el semen, tiene cifras normales de espermatozoides maduros (1, 3, 7, 12, 15).

5.6.2 Frecuencia de la eyaculación. La frecuencia de la eyaculación tiene un efecto directo sobre el volumen del semen y la concentración de espermatozoides (1, 3, 15). Se ha demostrado un leve decremento en la cifra espermática total por eyaculado cuando se obtienen muestras una a dos veces por día, en comparación con dos a tres veces por semana. Este decremento es atribuible a una disminución en la reserva de espermatozoides del epidídimo. Cuando se agota ésta, la declinación en la cifra de espermatozoides se estabiliza y las subsecuentes son respectivas de la velocidad de producción dentro de los testículos. De este modo, aunque la cifra espermática por eyaculado disminuye conforme aumenta el uso, los espermatozoides totales producidos por semana son relativamente constantes e incluso pueden aumentar con mayor actividad sexual (3). La cifra total de espermatozoides por eyaculado puede aumentar después de unos cuantos días de reposo, al parecer porque vuelve a llenarse la reserva del epidídimo. La libido se mantiene normal incluso cuando se hace eyacular a diario a los perros (3).

Siempre surge una pregunta “¿qué tan a menudo puede usarse al semental sin alterar la fecundidad?”. Las recomendaciones acerca de la frecuencia de uso deben ajustarse al perro individual. Lo que constituye un uso frecuente y el efecto que tiene sobre la libido y la calidad de semen son muy variables de un perro a otro (3). Se ha propuesto una pauta para el uso sexual de un perro sano que no afecta la calidad del semen: una vez cada 48 horas, a diario durante tres días y luego reposos durante dos días; o dos veces al día y después reposo durante dos días (3). Tal vez sea posible utilizar la mayor parte de los machos sanos una vez al día durante periodos prolongados sin causar oligospermia o subfertilidad. Sin embargo, aquellos con espermatogenesis defectuosa quizá no puedan cubrir estas demandas y presentan oligospermia (cifra espermática menor de 200 millones por eyaculado (3)). Un perro con uso sexual frecuente, oligospermia y subfertilidad puede recuperar la fertilidad cuando se usa con moderación, a fin de permitir que los espermatozoides se acumulen en el epidídimo (1, 3, 15).

5.6.3 Tamaño testicular. Se ha demostrado que el tamaño del parénquima testicular y, por tanto, las dimensiones de la glándula tienen correlación directa con la producción diaria de espermatozoides (1, 2, 3,15).

El ancho escrotal proporciona un índice objetivo del tamaño testicular y un método para detectar perros con testículos más pequeños de lo normal cuando se corrige el ancho escrotal para el peso corporal (3). Sin embargo, el ancho escrotal no es una medida precisa, ocurre una variación considerable en el ancho escrotal de los perros de cualquier peso corporal particular debido en parte, a diferencias de razas. Además, un ancho escrotal “normal” no indica que un perro esta produciendo espermatozoides (3).

5.7 VALORACIÓN FINAL DEL SEMEN

Para realizar la valoración final del semen se establecen los parámetros según dos grupos. En el primero se encuentran los parámetros con los cuales se valora principalmente la fecundidad del macho (Tabla 1) y el segundo grupo lo conforman las características adicionales (Tabla 2). (3)

5.7.1 Principales parámetros para valorar la fertilidad. (3)

Tabla 1. Parámetros de fecundidad

Parámetro	Valor
Espermatozoides totales	> 200 x 10 ⁶ por eyaculado
Movilidad espermática	> 70% con avance progresivo hacia adelante
Morfología de los espermatozoides	>70% de formas normales
Defectos primarios	< 10% de los espermatozoides
Defectos secundarios	< 20% de los espermatozoides

5.7.2 Parámetros adicionales. (3)

Tabla 2. Parámetros espermáticos adicionales.

Parámetro	Valor
Volumen del semen	Variable, de 1 a 40 ml. por eyaculado
Color del semen	Blanco a opalescente y opaco
pH seminal	6.3 a 6.7 (líquido prostático, 6.0 a 7.4)
Citología seminal	Eritrocitos, células epiteliales, leucocitos, bacterias ocasionales.

5.8 PROCESO DE CRIOPRESERVACION SEMINAL

El semen canino puede ser conservado mediante refrigeración o congelación, estos procesos disminuyen la tasa metabólica y prolonga la sobrevivencia espermática (1, 2, 5, 7). Los diluyentes de semen utilizados para la refrigeración y congelación protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica (5). La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes para semen debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen el espermatozoide de choque de frío (4, 8, 10, 11).

Tanto el tipo de diluyente usado como la temperatura de almacenamiento, son factores que poseen gran influencia sobre la capacidad fecundante del semen luego de la refrigeración y congelación (5).

Para la refrigeración y congelación se colecta la fracción espermática del semen canino y se mezcla con el diluyente elegido (1, 3, 10), el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución (5), entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4 (5). El semen así preparado puede refrigerarse a 4°C o 15°C (5, 6, 8, 10, 11) y utilizarse para inseminación artificial lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24-48 horas (5). Previo a la inseminación artificial el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (5).

La utilización de semen refrigerado y/o congelado con diluyentes protectores como el Tris-buffer suplementado con 20% de yema de huevo, permite conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un periodo de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes (4, 10, 11).

Los procesos de congelación-descongelación resultan en reducción de la fertilidad del semen criopreservado si se compara con el semen fresco (5, 7). Este hecho es el resultado tanto de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (5).

Los espermatozoides criopreservados exhiben modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, dichos eventos reducen la longevidad

espermática (5). Estos cambios similares a la capacitación espermática están relacionados con eventos que desestabilizan las membranas (5). Un aumento de la tasa de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y aumentando así la cantidad de espermatozoides con capacidad fecundante en la población de espermatozoides sobrevivientes luego de procesos de criopreservación. Existen variados tipos de daños asociados tanto al enfriamiento propiamente dicho como a los componentes de un diluyente (5, 6). Estos daños están relacionados con los cambios de temperatura (shock frío), la toxicidad de los crioprotectores y disolución de hielo en el medio ambiente extracelular (5). Cada paso del protocolo de criopreservación podría afectar la estructura de la membrana así como el metabolismo y la función celular. Sin embargo los pasos están interrelacionados entre sí y un cambio en uno de ellos puede modificar el efecto de otras variables (5, 7).

Las primeras preñeces obtenidas en caninos a partir de inseminación artificial con semen congelado fueron logradas utilizando lactosa y un diluyente con base Tris (5, 7). Desde entonces, variados diluyentes han sido evaluados para su uso en caninos, sin embargo los diluyentes en Tris Base son aún los usados más frecuentemente (5, 4, 7). En la actualidad, el glicerol es el crioprotector más usado con más frecuencia en la preparación de diluyentes de semen (6, 7, 8, 10), habiendo sido utilizado también del dimetilsulfoxido (DMSO) (5). Existen otros compuestos como el duodecil sulfato de sodio (SDS), glicina betaina, prolina y metilxantinas que han sido incluidos en los diluyentes utilizados para congelación de semen canino (5).

La yema de huevo previene la aparición de colas dobladas y protege la motilidad (5, 7). El compuesto activo en la yema de huevos la fracción de lipoproteína de baja densidad, una molécula de alto peso molecular que solo puede actuar en la superficie celular (5, 7).

Diferentes tipos de azúcares han sido incluidos en los diluyentes usados para congelación de semen canino. Los azúcares utilizados poseen variadas funciones así como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la

presión osmótica del diluyente y actuar como crioprotectores (5). Se ha estudiado la influencia de los azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos), sobre la motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, equilibrio y congelación de espermatozoides caninos. (5)

5.8.1. Criopreservación de semen canino. Durante los procesos de congelación y descongelación de semen canino las células se exponen a un medio hiperosmótico lo que genera una contracción celular inicial, luego las células recuperan su forma y tamaño cuando el crioprotector ingresa en estas. El proceso de enfriamiento celular también genera cambios en la membrana. Al iniciar la congelación, las células, sufren una nueva contracción debido a que el agua sale del interior de estas. En el espacio extracelular se forman cristales de hielo que, según la tasa de enfriamiento, puede llevar a la formación de estos cristales en el interior de las células. Los cristales causan daños en la membrana generando que pierda su semipermeabilidad y finalmente haya muerte celular. Durante la descongelación hay variación en el volumen del agua debido a que esta aumenta su entrada al interior de la célula. La tasa de descongelación y la supervivencia de la célula dependen de la razón de enfriamiento usada durante el proceso. (26). Según Bruce E. Eilts, el semen debe ser descongelado a 37°C durante 30 segundos, mientras otros estudios reportan que se obtienen mejores tasas de supervivencia al descongelar el semen durante 1 minuto a 37 °C. (6, 9, 11).

Aunque todas las razas de perros presentan una morfología y motilidad similar de las células espermáticas antes de ser sometidas a procesos de congelación, algunos estudios han demostrado que algunas razas muestran mejores tasas de supervivencia seminal que otras, causadas por diferencias genéticas en la estructura de la membrana celular lo que da como resultado alteraciones en la permeabilidad y el intercambio de agua y una mayor o menor formación de cristales de hielo intracelulares. (26) La motilidad es el criterio más comúnmente utilizado para la evaluación del semen antes y después de ser sometido a procesos de congelación. (27)

5.8.2 Crioprotectores y diluyentes. Los crioprotectores son solutos que favorecen la protección celular contra el enfriamiento extremo (Lazar *et al*, 2000). A pesar de ser moléculas neutras, la mayoría de los crioprotectores poseen algún nivel de citotoxicidad que depende directamente de la temperatura y el tiempo de exposición de las células a ellos (Kobayashi *et al*, 1994).(7)

La yema de huevo es un crioprotector de tipo no permeante que recubre la membrana celular sin atravesarla, estabilizándola y sirviendo como buffer osmótico para prevenir el daño celular durante los procesos de deshidratación e hidratación (Mizukam *et al*, 1999; Kobayashi *et al*, 1994). (7, 8)

Además de estos crioprotectores, el uso de agentes como el DMSO (Dimetil Sulfoxido) y el OEP (Orvus Es Paste) favorecen el intercambio de agua por crioprotector durante el periodo de equilibrio ya que permeabilizan la membrana, con lo cual hacen más eficiente el proceso de criopreservación (Tsutsui *et al*, 2000a). (7)

Los diluyentes son una mezcla de compuestos que permiten la supervivencia celular durante los procesos de congelación/descongelación debido a que ayudan a estabilizar la membrana celular e imitan las características fisiológicas de los fluidos orgánicos. Si se adiciona un crioprotector se modifica la osmolaridad lo que disminuye el riesgo de deshidratación celular. Existe poca información acerca de estrés osmótico durante los procesos de criopreservación de semen canino. (26)

Usualmente se usan, como diluyentes, un buffer de pH como citrato de sodio, un buffer osmótico como Hepes, una fuente de energía como glucosa o fructosa (Ponglowhapan *et al*, 2004), antibióticos como penicilina o estreptomina, y un medio excipiente como Tris o TALP (Tyrodes Albumin Lactate Piruvate). (8)

Aunque el criopreservante reduce las lesiones por el congelamiento se ha demostrado que daña al espermatozoide durante la adición y la remoción y durante el congelamiento y descongelamiento.(27)

5.8.3 El glicerol como criopreservante. El glicerol ($C_3H_8O_3$) (19), es un alcohol polihídrico de alta permeabilidad (10, 11)

El crioprotector más utilizado en congelación de semen ha sido el glicerol (6, 7, 8,10), que es un crioprotector de tipo permeante (que atraviesa la membrana) (Holt, 2000), tiene baja toxicidad y la propiedad de prevenir los cambios entre la fase líquida y de gel en la membrana plasmática celular, mejorando la permeabilidad y fluidez, como desventaja tiene su peso molecular de 92.1 KDa que le impide atravesar con rapidez las membranas y lo convierte en un factor contribuyente a la presentación del choque osmótico (Shaw *et al*, 2003; Kobayashi *et al*, 1994). El glicerol es el crioprotector más ampliamente utilizado para congelamiento de semen de canino y a pesar de su efecto potencialmente tóxico, se ha encontrado una concentración segura de 6% en adición de un solo paso (Silva *et al*, 2003).

Algunos autores reportan que, este crioprotector puede tener efectos tóxicos relacionados con, alteraciones físico químicas que pueden generar ruptura o remoción de importantes proteínas de la membrana que puede inducir a la pérdida de la cabeza del espermatozoide (27, 29), pero también se han observado daños acrosomales (5, 10, 11).

Los efectos tóxicos generan una disminución en la fertilidad. La concentración del glicerol debe lograr un balance entre sus efectos protectores y su efecto tóxico (10, 11). En diferentes crioprotectores usados en semen de perros y zorros la concentración final de glicerol varía entre 2-10%. (11)

Las concentraciones tóxicas del glicerol pueden ser influenciadas por otros patrones como los métodos de refrigeración y congelación, pero los principales factores involucrados en el establecimiento de la concentración ideal de glicerol son las características del semen de cada especie (10, 11).

Fontbonne y Badinand (30) realizaron un estudio para comparar los resultados al adicionar el glicerol en forma fraccionada o completa y concluyeron que no había diferencias entre los dos métodos después de descongelar las muestras.

En un estudio realizado por SOARES R. et al (27) se encontró que al congelar semen canino usando glicerol a una concentración del 4% hubo más motilidad y más alteraciones morfológicas con respecto a la concentración del 6% que mostró menor motilidad pero menores alteraciones morfológicas. Por otra parte al trabajar con una concentración del 8% se obtuvieron mejores resultados en cuanto a daños morfológicos pero la tasa de vitalidad de los espermatozoides fue menor en comparación con la concentración del 6%. De este estudio se puede concluir que la mejor concentración del glicerol para procesos de congelamiento es al 6% sustentado también por Silva A.R et al (28), y Ravaszova O et al (29).

En el estudio realizado por SOARES R. et al (27) también se concluyó que concentraciones del 4% o mayores tienen efectos adversos en la supervivencia de los espermatozoides caninos antes del congelamiento. Después de realizado el proceso de congelación y descongelación la supervivencia de los espermatozoides caninos fue mejor cuando la concentración en el diluyente era superior al 8%.

5.9 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA POS DESCONGELACIÓN.

La pobre longevidad observada en los espermatozoides caninos, luego de la descongelación, es probablemente la causa más importante de los bajos porcentajes de preñez obtenidas al inseminar intravaginalmente con semen descongelado, como se realiza normalmente con el semen fresco o refrigerado, y no dentro del útero (5). Por ello es importante, en los espermatozoides congelados – descongelados de esta especie, el adecuado análisis de parámetros que influyen directamente sobre la capacidad fécula de los espermatozoides, como son los estudios de la viabilidad espermática, del estado acrosomal, como también ensayos de interacción gamética de la descongelación (5).

La motilidad espermática es evaluada normalmente en la criopreservación del semen como parámetro de clasificación, pero es importante considerar que esta característica no es suficiente por si sola para ser correlacionada con la fertilidad, especialmente en aquellas especies como la canina, en la cual la capacidad fecundante se reduce en forma considerable en el tiempo luego de su almacenamiento a bajas temperaturas (5). No obstante la característica de motilidad da información sobre la reacción espermática en un medio adverso. La motilidad progresiva de los espermatozoides debe considerarse en conjunto con otros parámetros de evaluación, ya que aunque la motilidad es un primer criterio de evaluación y una expresión de viabilidad espermática, eso también depende del medio en el cual son expuestos los espermatozoides y no siempre se considera una medición confiable de la proporción de células viables con capacidad fecundante (5).

Una mejor estimación de la proporción de espermatozoides viables se puede lograr a través del estudio de la integridad de la membrana plasmática, una membrana intacta es esencial para la función del espermatozoide ya que una vez esta es dañada no puede ser restituida. Se han propuesto diversos protocolos de evaluación de la viabilidad celular en el semen descongelado, tales como: pruebas con tinción supervitales, fluorescentes, y estudios de microscopia electrónica (5).

Por otra parte, se ha encontrado que la motilidad de los espermatozoides de perro durante el enfriamiento y luego en la descongelación, no se correlacionan con la integridad acrosomal; por lo que una muestra espermática puede mantener una buena motilidad, pero bajo capacidad fecundante cuando su acrosoma esta dañado, y la integridad acrosomal puede alterarse en forma importante durante la congelación (5).

La integridad del acrosoma es de vital importancia para la interacción gamética y posterior fecundación, de su integridad dependerá la ocurrencia normal de la reacción acrosomica durante la capacitación espermática, evento clave que regula la fecundación en los mamíferos; la capacitación espermática involucra los cambios que preparan a los espermatozoides para hiperactivación y reacción acrosomica, esta ultima es un

prerrequisito para la presentación de la zona pelucida y para la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, constituyendo un mecanismo de control de la fecundación(3,5,7). La evaluación del estado acrosomal, debe ser un parámetro importante de evaluar en el semen que se ha sometido a congelación. La evaluación del estado acrosomal se ha efectuado a través de diversos métodos en espermatozoides caninos que han sido congelados, determinándose que la correcta visualización del acrosoma depende en forma importante de la tinción utilizada, encontrando un porcentaje significativo de espermatozoides con el acrosoma alterado luego de la congelación y descongelación (5) .

Estudios en espermatozoides congelados han relacionado el efecto de someter los espermatozoides a bajas temperaturas y el tiempo requerido en la capacitación, sugiriendo una diferente funcionalidad entre los espermatozoides frescos y congelados. Esto estaría dado por cambios a través de la membrana, especialmente en los canales de calcio, permitiendo un mayor flujo de calcio y provocar cambios similares a la capacitación espermática de los espermatozoides congelados y descongelados, lo que podría explicar en parte, la reducción en el tiempo de vida fértil de los espermatozoides criopreservados. En estudios con semen de perro, congelado y descongelado se observa un incremento significativo de espermatozoides reaccionados entre las 0 y 2 horas de incubación en medio capacitante, evaluados mediante el ensayo de clortetraciclina (5).

La evaluación óptima *invitro*, con relación a la capacidad fecundante de los espermatozoides caninos que han sido congelados, la dan los estudios que miden la interacción del espermatozoide con las capas más externas del ovocito (5). La evaluación de la interacción gamética en espermatozoides criopreservados ha demostrado que el daño producido por la congelación y descongelación afecta significativamente la funcionalidad espermática en relación a su capacidad de unión y penetración a la zona pelucida. En esta especie se han utilizado los ensayos de interacción de espermatozoides con zonas pelucidas como también ensayos con emizonas del ovocito de perra (5).

Un aumento sustancial en las tasas de preñez es difícil de lograr a menos de que se puedan investigar adecuadamente los parámetros espermáticos relacionados directamente con la fertilidad, que se puede alterar durante el proceso de congelación a bajas temperaturas en el semen canino; es por ello que estas investigaciones deben incluir la evaluación de parámetros de funcionalidad espermática, ello lograría diseñar protocolos adecuados para la criopreservación de semen canino que permita la utilización y difusión, aumentando su potencialidad y rendimiento reproductivo (5).

6. HIPÓTESIS

El semen canino criopreservado a diferentes concentraciones de glicerol (4%, 6% y 8%) mostrara variaciones en las características fecundantes del mismo lo que permitirá establecer cual de las concentraciones es la adecuada para la congelación de semen canino en la raza Labrador.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de glicerol como criopreservante, sobre los parámetros seminales (morfología, vitalidad, motilidad, concentración y pH) del semen canino después de ser sometido a procesos de congelación.

7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Comparar concentraciones de glicerol para definir con cual se conservan mejor las características fecundantes del semen canino.
2. Establecer las diferencias en cuanto a vitalidad (porcentaje de espermatozoides teñidos con eosina), morfología (porcentaje de formas normales, anomalías primarias y secundarias) y en las muestras congeladas a diferentes concentraciones de glicerol, para establecer los cambios en los parámetros seminales del semen canino.
3. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de glicerol sobre la motilidad del semen canino sometido a procesos de congelación-descongelación.

8. DISEÑO METODOLÓGICO

8.1 ENFOQUE METODOLÓGICO Y TIPO DE ESTUDIO

El estudio es de tipo experimental ya que busca evaluar el efecto del glicerol al 4%, 6%, 8% sobre la viabilidad del semen canino sometido a criopreservación en nitrógeno líquido. Esto se define como intervención específica que es el componente básico en el estudio de tipo experimental.

8.2 ANIMALES

Se tomarán muestras de 12 labradores machos sometidos a iguales condiciones de manejo y alimentación, los cuales se encuentran en un rango de edad de entre 1.5 - 7 años. Se les realizó un examen físico completo con un enfoque a la evaluación reproductiva de los mismos, teniendo en cuenta también, su historia reproductiva.

En total se tomaron 12 muestras de semen. De cada eyaculado se tomará una fracción que será destinada a cada uno de los tratamientos (concentraciones de Glicerol al 4%, 6%, 8% y control) dando un total de 48 muestras de las cuales se congelarán 36 correspondientes a las tres diferentes concentraciones de glicerol (4%, 6%, 8%) y las 12 restantes (control) se refrigeraron sin criopreservante durante 24 horas.

8.3 DISEÑO MUESTRAL

Las muestras de semen se obtuvieron por manipulación digital, usando gasas y/o hisopos con secreciones vulgares (feromonas) de perras en celo (1, 2, 6), para la estimulación de

los machos. Para el estudio se usó la segunda fracción del eyaculado (fracción espermática) (1, 2, 3, 6).

En el semen fresco se evaluó el volumen, el color, el pH, movilidad, concentración, vitalidad y morfología. Para esta evaluación se utilizó un microscopio binocular de contraste de fases; además las tinciones se realizaron con eosina y tinta china.

Sólo fueron congeladas las muestras de semen que presenten, durante la evaluación, las características óptimas, teniendo en cuenta los siguientes valores (Tabla 3). (3)

Tabla 3. Parámetros para establecer la viabilidad del semen para procesos de congelación.

PARAMETRO	VALOR DE REFERENCIA
Concentración espermática	> 200 millones de espermatozoides/ml
Movilidad	> 70% con avance progresivo
Morfología	>70% de formas normales
Anomalías primarias	< 10% de los espermatozoides
Anomalías secundarias	< 20% de los espermatozoides
Mortalidad	<20% de los espermatozoides
Volumen	Variable.
Color	Blanco a opalescente y opaco
Ph	6.3 a 6.7

Para la dilución del semen se utilizó diluyente a base de TRIS y yema de huevo (Tabla 4). Al semen se le adicionó la primera mitad del diluyente preparado cuando se encontraba a una temperatura entre 37-25°C (posterior a la recolección) (8, 9, 10). Luego fue equilibrado durante 40 minutos hasta alcanzar una temperatura de 15°C (8, 9, 10), con una velocidad de congelación de 0.30°C/min (11, 27). Posteriormente se refrigeró durante 30 minutos llevándolo a una temperatura de refrigeración de alrededor de 4°C (6, 8, 9, 10, 11) con una tasa de congelación de 0.37°C/min (27). Antes de realizar la congelación del

semen se añadió la segunda mitad del diluyente la cual contiene el glicerol al 4%(8), 6%(8) y 8% (10, 11). Una vez terminada la segunda dilución el semen se empacó en pajillas de 0.5 mL (6, 8).

Tabla 4. Composición de los diluyentes utilizados para el proceso de congelación. (4, 8, 10, 11).

INGREDIENTE	Diluyente 1	Diluyente 2	Diluyente 3
TRIS (trizma base)	3.028g	3.028g	3.028g
Acido cítrico	1.25g	1.25g	1.25g
Glucosa	0.8 g	0.8g	0.8g
Penicilina benzatinica	100mg	100mg	100mg
Sulfato de estreptomycin	0.1g	0.1g	0.1g
Yema de huevo	20%	20%	20%
Glicerol	4%	6%	8%
Agua destilada	Hasta completar 100mL	Hasta completar 100mL	Hasta completar 100mL

La congelación del semen seleccionado se hizo utilizando nitrógeno líquido. Como primer paso la muestra fue colocada a 5 centímetros sobre el nivel del nitrógeno líquido por un periodo de 5 minutos, para que alcanzara una temperatura promedio de -70°C ; y trascurrido este tiempo se sumergió en el mismo. (8, 9, 10, 11)

Las muestras fueron divididas en cuatro tratamientos: cada uno fue analizado de acuerdo a la concentración de glicerol a los que sean sometidos cada una de las muestras repartidos así:

- Tratamiento 1: Glicerol al 4%
- Tratamiento.2: Glicerol al 6%
- Tratamiento 3: Glicerol al 8%
- Grupo No.4: Grupo control, sin criopreservante.

Finalmente la descongelación del semen se realizo, poniendo las pajillas en agua a una temperatura de 37°C durante 1 minuto. (6, 8, 9, 10, 11), 72 horas después de congeladas.

8.4 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

8.4.1 Diagrama de variables. Los datos y variables fueron evaluados de acuerdo al formato de evaluación seminal (Figura 4). Este se en la evaluación inicial del semen y en la posdescongelación.

Dentro del formato de análisis de variables se incluyen los datos generales del paciente y las observaciones (estado de salud, alteraciones reproductivas).

Igualmente se incluye volumen y color con el fin de tener una mejor apreciación de la calidad macroscópica del semen, pero solo fueron objeto de evaluación y comparación la movilidad, la morfología, la vitalidad, la concentración y el pH.

Figura 4. Formato de evaluación seminal

Nombre del perro: _____

Edad: _____ Peso: _____

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones: _____

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)				2,5 a 3ml
Color	NA			Blanco a opalescente y opaco
pH				6.3 a 6.7
Vitalidad				20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)				70% o más
Formas normales (%)				70% o más
Anomalías primarias (%)				Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)				Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)				200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia
A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia
NA: No aplica

8.5 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

La información contenida en este proyecto es resultado de la búsqueda en libros, base de datos, publicaciones de trabajos experimentales, proyectos de tesis y artículos científicos actuales ; todos involucrados con el tema de la criopreservación de semen canino, procesos de congelación incluyendo la descripción de los datos para el desarrollo de esta biotecnología, fisiología de la reproducción del macho, características seminales, toma de muestras de semen canino, manipulación, análisis macroscópico y microscópico de la misma.

8.6 CONTROL DE ERRORES Y SEGOS

Para disminuir los errores relacionados con la toma de muestra de semen, la evaluación microscópica de las variables (morfología, motilidad y vitalidad) pre y post descongelación se tendrán en cuenta los siguientes aspectos.

1. Todas las muestras fueron tomadas en horas de la mañana.
2. La recolección de la muestra fue tomada por la misma persona con técnica digital.
3. Para el muestreo de los animales se realizo desinfección en la zona prepucial con los mismos productos.
4. Se hizo la mínima manipulación de la muestra antes de la evaluación conservándolas en termos bajo las mismas condiciones.
5. El muestreo se hizo en 6 días; por día se tomaron muestras de dos animales los cuales se evaluaron inmediatamente y fueron sometidos al proceso de congelación utilizando la concentración de glicerol correspondiente al día de trabajo así:
 - Día 1: Evaluación de las variables pre congelación y congelación de semen de perros 1 y 2 concentración de glicerol al 4%, 6%, 8% y grupo control.

- Día: 2: Evaluación de las variables pre congelación y congelación de semen de perros 3 y 4 concentración de glicerol al 4%, 6%, 8% y grupo control.
 - Día: 3: Evaluación de las variables pre congelación y congelación de semen de perros 5 y 6 concentración de glicerol al 4%, 6%, 8% y grupo control.
 - Día 4: Evaluación de las variables pre congelación y congelación de semen de perros 7 y 8 concentración de glicerol al 4%, 6%, 8% y grupo control.
 - Día 5: Evaluación de las variables pre congelación y congelación de semen de perros 9 y 10 concentración de glicerol al 4%, 6%, 8% y grupo control.
 - Día 6: Evaluación de las variables pre congelación y congelación de semen de perros 11 y 12 concentración de glicerol al 4%, 6%, 8% y grupo control.
6. Los equipos usados para la evaluación y análisis de las variables fueron aptos para las necesidades de la investigación con posterior calibración de los mismos y supervisión de su buen funcionamiento.

8.7 TECNICA DE PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS

El diseño experimental por medio del cual se realizo el procesamiento de los datos es un diseño completamente al azar con análisis de contrataste entre grupos por que se busca encontrar diferencias significativas entre cada uno de los grupos (tratamientos) los cuales están formados por individuos elegidos al azar (todos los tratamientos tienen el mismo numero de animales y uno de estos tratamientos es el control).

Para el análisis de los resultados se realizo un análisis de varianza, una prueba de homogeneidad de la muestra y contraste múltiple de rangos.

La información obtenida fue analizada por medio de Start Grafic 5.1 y finalmente se compararon los resultados obtenidos para cada tratamiento pre y post descongelación e igualmente entre los diferentes tratamientos.

8.8 PLAN DE DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

El trabajo de investigación será entregado a la Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia de la Universidad CES como proyecto de tesis, con los formatos establecidos por la misma. El análisis y divulgación de los resultados se realizará después del uso de técnicas estadísticas que permitirán unir las variables a evaluar de forma exacta para conocer las diferencias entre los tratamientos utilizados durante el estudio y así tener buenos argumentos para la discusión de los resultados y lograr aportar información concreta y verídica sobre el tema.

La divulgación de la investigación, resultados y análisis de los mismos se hizo en las jornadas de investigación programados por la universidad que generalmente se han realizado en el segundo semestre del año.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Como estudiantes y profesionales del área de la Salud animal, tendremos en cuenta todas las precauciones necesarias para evitar causar daño a los animales que serán objeto de estudio durante el desarrollo de la investigación. Todo el personal involucrado está capacitado para la manipulación de los animales, la toma de las muestras de semen y el posterior análisis en el laboratorio.

Todos los materiales usados fueron aptos para el proceso investigativo y así evitar dificultades para el análisis y lesiones a los pacientes involucrados en el proceso.

Todo lo publicado es verídico y sin modificaciones para lograr conseguir el objetivo del trabajo.

10. RESULTADOS

Luego del análisis estadístico se analizan los resultados de las variables que fueron evaluados, pre y posterior al proceso congelación del semen, evaluando los parámetros mencionados con anterioridad. En la tabla 5 se presentan las variables vitalidad, movilidad y concentración como las de mayor importancia debido a su resultado estadístico, sin embargo aunque no es estadísticamente significativa la variable formas primarias es de importancia en los resultados de criopreservación de semen.

Tabla 5. Determinación de las variables evaluadas en los procesos de criopreservación seminal.

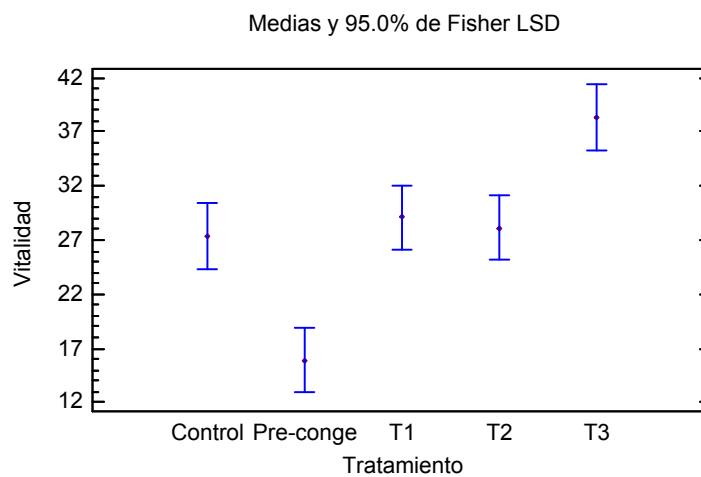
VARIABLE	EFEECTO TRATAMIENTO (p-valor)
pH	0,6058
VITALIDAD	0,0000 *
MOVILIDAD	0,0000 *
MORFOLOGIA	
FORMAS NORMALES	0,1225
ANOMALIAS PRIMARIAS	0,0644
ANOMALIAS SECUNDARIAS	0,7125
CONCENTRACION	0,0000 *

**los valores de probabilidad (p- valor) menores de 0.05 son estadísticamente significativos, con un nivel de confianza de 95%*

El valor P de la variable vitalidad fue menor a 0.05, lo que indica que es estadísticamente significativo (figura 5), para esto el método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Indicando que no existen diferencias significativas entre el control, T1 y T2, pero si las hay entre estos con la precongelación y T3. Según los resultados obtenidos se puede decir que la vitalidad

esta directamente relacionada con el nivel de glicerol y que además esta se ve influenciada por la refrigeración como se observa en el grupo control. Los niveles de vitalidad (cantidad de espermatozoides muertos, teñidos con eosina) más altos fueron los del grupo T3, los menores fueron los del control y no hubo cambios significativos entre T1 y T2.

Figura 5. Determinación de la vitalidad en los tratamientos evaluados.

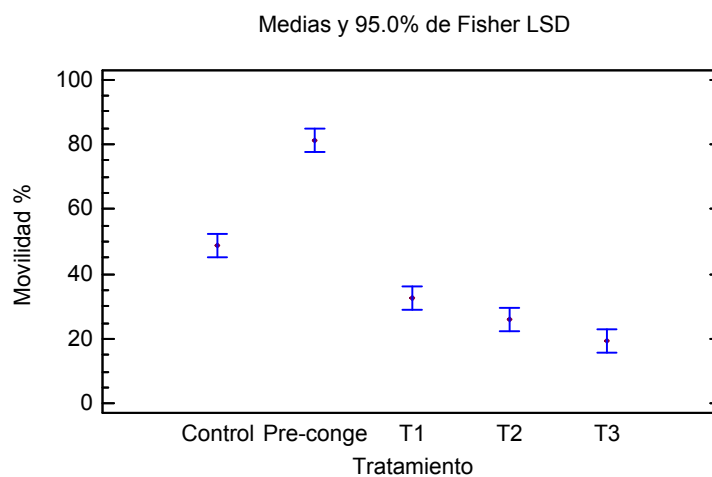


Control: semen refrigerado durante 24 horas sin glicerol. **Pre- congelación:** semen evaluado antes de congelar, sin glicerol. **T1:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 4% de glicerol. **T2:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 6% de glicerol. **T3:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 8% de glicerol

Se realizó un análisis de varianza de varios factores para la movilidad. Realizando varias pruebas y gráficas para determinar que factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre esta. Para cada factor significativo, se realizaron Pruebas de Rangos Múltiples determinando que hay diferencias estadísticamente significativas. También se evaluó la significancia de las interacciones entre los factores, luego de esto se pudo observar que no existen diferencias significativas entre T2 y T3, ni entre T2 con T1. Pero

se observa que si existen diferencias significativas entre T1, T3, control y pre-congelación. Según los resultados obtenidos se puede decir que la movilidad esta directamente relacionada con el nivel de glicerol y que además esta se ve influenciada por la refrigeración como se observa en el grupo control. Los niveles de movilidad más altos fueron los del grupo control seguidos por el grupo T1. Es razonable que el grupo control haya tenido niveles de movilidad más altos debido a que este no fue sometido al proceso de congelación y no se le adiciono glicerol. Los valores de movilidad más bajos se observaron en el grupo T3, lo cual permite concluir que la movilidad tiene una relación directa con la concentración de glicerol. Hay que resaltar que no existe diferencia significativa entre T1 y T2 y que tampoco existe diferencia significativa entre T2 y T3; pero si la hay entre T1.

Figura 6. Determinación de la movilidad en los tratamientos evaluados.

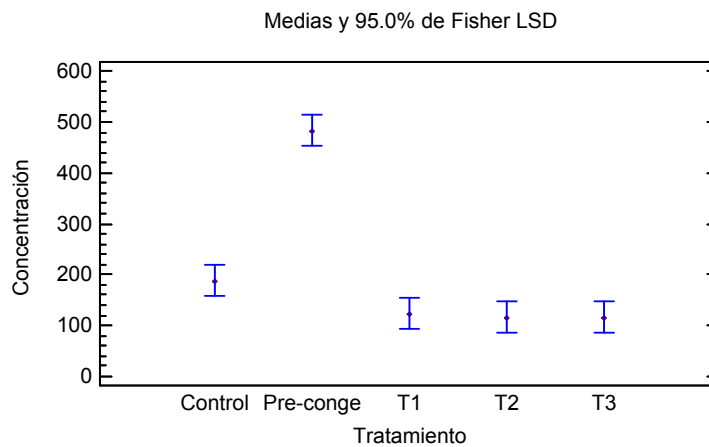


Control: semen refrigerado durante 24 horas sin glicerol., **Pre- congelación:** semen evaluado antes de congelar, sin glicerol. **T1:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 4% de glicerol. **T2:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 6% de glicerol. **T3:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 8% de glicerol.

Se realizó un análisis de varianza de varios factores para la concentración. Realizando varias pruebas y gráficas para determinar que factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre esta. Para cada factor significativo, se realizaron Pruebas de Rangos Múltiples determinando que hay diferencias estadísticamente significativas.

También se evaluó la significancia de las interacciones entre los factores, luego de esto se pudo observar que no existen diferencias significativas entre T1, T2 y T3 pero sí las hay entre estos con la precongelación y el control.

Figura 7. Determinación de la concentración en los tratamientos evaluados.



Control: semen refrigerado durante 24 horas sin glicerol., **Pre- congelación:** semen evaluado antes de congelar, sin glicerol., **T1:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 4% de glicerol. **T2:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 6% de glicerol **T3:** semen congelado y posteriormente descongelado con una concentración de criopreservante al 8% de glicerol.

Los resultados obtenidos para las variables, pH, morfología, formas normales, anormalidades primarias y secundarias, obtuvieron un valor de P mayor a 0.05; indicando que no existen diferencias estadísticamente significativas.

11. DISCUSIÓN

La concentración óptima de glicerol para realizar procesos de criopreservación seminal en perros depende de muchos factores. Entre los que vale la pena resaltar, el tipo de diluyente, la velocidad de congelación-descongelación y los métodos utilizados para estos procesos. Por las interacciones existentes entre estos factores no se ha logrado establecer un índice claro de concentración adecuada de glicerol para realizar procesos de congelación de semen con buenos resultados de criopreservancia en perros.

Los resultados obtenidos durante el presente estudio muestran que estadísticamente y con un nivel confianza del 95% el pH no varía con respecto al control para ninguno de los tratamientos. En la literatura se reporta poca información de pH post- descongelación aunque teóricamente el pH del diluyente puede disminuir debido a la actividad metabólica de los espermatozoides (42). Adicionalmente es sabido que altas variaciones del pH durante procesos de criopreservación conllevan a un aumento en la mortalidad (42). La rata de congelación debe ser suficientemente lenta para evitar la formación de cristales de hielo, pero lo suficientemente rápida para evitar variaciones del pH debidas a acumulación de solutos que pueden debilitar la membrana celular generando disturbios en el mismo (42) al no observarse evidencia de cambios estadísticamente significativos en el pH se puede decir que la rata de congelación utilizada en el presente estudio es adecuada, desde el punto de vista del pH, para procesos de criopreservación similares. Estudios similares han mostrado que disminuciones del pH son observadas luego de 3-4 días de la refrigeración del semen canino diluido en Tris-yema de huevo (43) lo cual puede explicar por que en el presente estudio no se observaron variaciones de pH en el grupo control debido a que el semen fue refrigerado solo durante 24 horas, adicional mente algunos

autores han reportado que este diluyente ofrece una alta estabilidad en el pH de la muestra (43).

Al observar los resultados de vitalidad y recordando que el porcentaje de vitalidad es el número de espermatozoides teñidos con eosina (cantidad de espermatozoides muertos por cada 100); los mejores resultados obtenidos para esta variable se le atribuyen a los menores valores (4% y 6%)(8, 10). En el presente estudio se encontró que la mejor vitalidad, excluyendo el control, se obtuvo en aquellas muestras que fueron sometidas a concentraciones del 6% de glicerol (28.16 %) aunque estadísticamente no se encontró diferencias significativas entre el control y las muestras sometidas a 6% y 4% glicerol. Según lo anterior se puede decir que concentraciones de glicerol entre el 4 y el 6% no presentan variaciones estadísticamente significativas con respecto al control, para este estudio; mientras que con una concentración de 8% de glicerol se observó un aumento en el número de espermatozoides muertos. Además, es importante mencionar que aunque se observó un alto deterioro en la vitalidad del semen sometido a procesos de criopreservación, en relación con el control y la precongelación, los valores obtenidos fueron similares a valores previamente reportados para procesos de congelación de semen canino, además los resultados son compatibles con fertilizaciones exitosas realizadas con semen criopreservado (41).

La motilidad es el parámetro más importante durante la evaluación seminal, la mayoría de los investigadores utilizan este parámetro como el determinante al evaluar técnicas de congelación, diluyentes y crioprotectores (10, 26, 31). En el presente estudio se encontró que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones del 4% y 6% de glicerol. Este resultado concuerda con el de otros autores (32) quienes también encontraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en la movilidad para semen congelado y posteriormente descongelado con glicerol al 4% y al 6% como criopreservante. Según el presente estudio los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de 4% y 6% similar a lo encontrado por otros investigadores quienes sugieren que la mejor concentración de glicerol es 6% (8, 25) y 4 % (8, 26). Por otra parte los resultados difieren de los obtenidos por Al Peña (32)

quien encontró que los mejores resultados de movilidad se obtuvieron para concentraciones del 8%. Es importante resaltar que en la literatura se encuentran estudios que dicen que los mejores resultados se obtienen con concentraciones del 2% (33), además, se han encontrado mayores discordancias en los resultados utilizando poco glicerol -1.6%- 3%- (33, 34, 35) o altas concentraciones del mismo -8%-12%- (36). Al observar el rango de valores de movilidad obtenidos en este estudio se encuentra que los valores son relativamente bajos ya que las medias se encuentran entre 19% y 33%. Al compararlo con los resultados de otras fuentes en la literatura se ve que los resultados caben entre los rangos encontrados, ya que ha habido estudios con medias de movilidad del 14% (32) hasta 70% (37). Vale la pena resaltar que para procesos de inseminación artificial se sugiere tener una movilidad espermática entre 40% y 50 % (8, 26) aunque, se ha logrado obtener preñeses con valores de movilidad entre el 20% y el 30% (26); por lo tanto los valores obtenidos durante este estudio son suficientes para lograr preñeses exitosas. Probablemente en este estudio la reducción de la movilidad del semen sometido a procesos de congelación- descongelación pudo verse influenciada por largos periodos de transporte desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, lo cual puede reducir las reservas metabólicas de los espermatozoides (8) haciéndolos más susceptibles a sufrir cambios durante la refrigeración, congelación y descongelación, es posible que comenzando el proceso de criopreservación inmediatamente después de la recolección del semen se obtengan mejores cualidades espermáticas en el semen pos-descongelación.

Con relación al porcentaje de formas normales, anomalías primarias y secundarias los resultados muestran que no existe correlación directa entre la concentración de glicerol y un aumento en la incidencia de anomalías morfológicas. Resultados similares fueron encontrados en otros estudios en los cuales se observó un aumento en las anomalías secundarias, pero estas no fueron estadísticamente significativas (10). Al comparar los resultados obtenidos con los de otros autores se puede ver que los valores en el presente estudio para formas normales y anomalías secundarias son comparables con los resultados obtenidos por otros autores quienes han encontrado que semen con valores porcentuales similares a los obtenidos en este estudio, pueden ser utilizados

efectivamente en procesos de inseminación artificial con semen congelado y posteriormente descongelado (27). Hay que destacar que el porcentaje de anomalías primarias en este estudio fue alto comparativamente con estudios similares (27, 10, 38), sin embargo, este porcentaje fue alto incluso en el análisis precongelación. De acuerdo con lo dicho por Johnston et al (2001), las anomalías primarias se originan durante la producción espermática y la manipulación del semen no tiene influencia en estas. Con relación a las anomalías secundarias algunos estudios reportan aumento en estas siendo la anomalía más común colas dobladas (40); aunque en este estudio no se realizó diferenciación porcentual de las anomalías secundarias los investigadores observaron una gran incidencia de colas dobladas. Adicionalmente la literatura reporta que las anomalías secundarias son generalmente originadas por los cambios de temperatura a los que es sometido el semen durante este tipo de procesos (40).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la concentración espermática entre los tratamientos. Hay que aclarar que las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos y la precongelación fue debida a que la distribución seminal entre los diferentes tratamientos se realizó buscando concentraciones espermáticas de 200 millones de espermatozoides/ml utilizando la fórmula explicada anteriormente en los resultados. Los resultados obtenidos al relacionar los tratamientos y la precongelación son coherentes ya que no tiene por que existir una relación entre la concentración de glicerol y la concentración espermática, sin embargo la medición de este parámetro ayuda a evaluar el proceso y método empleado para la criopreservación seminal. En este estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los diferentes tratamientos. Cabe mencionar que para el control también se usaron pajillas de 0.5 ml con concentraciones de 200 millones de espermatozoides/ml lo cual explica las diferencias encontradas entre la precongelación y el control. Sin embargo las diferencias encontradas entre el control y los tratamientos son posiblemente debidas a errores en el conteo.

12. CONCLUSIONES

En el presente estudio se puede concluir que las mejores concentraciones para procesos de congelación de semen canino se encontraron para las concentraciones de 4 y 6%, aunque con respecto a la vitalidad fueron mejores los resultados atribuidos a concentraciones del 6%; además los valores medios para la mayoría de las variables fueron algo mejores para el 6% de glicerol.

Concentraciones de 4% y 6% de glicerol fueron las que mejor conservaron las características fecundantes del semen. Adicionalmente vale la pena resaltar que los resultados obtenidos, aunque se encontraron dentro de los valores reportados en la literatura fueron bajos; sin embargo con resultados similares se han reportado preñeses exitosas por inseminación artificial (IA).

La concentración de glicerol no tuvo ningún efecto en las variables morfología y pH. Sin embargo se encontró que valores del 8% de glicerol tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la vitalidad, mientras que con valores del 4% y el 6% no se encontró variación en esta. Además los resultados obtenidos permiten concluir que al no observarse variaciones en el pH la rata de congelación utilizada en el presente estudio fue adecuada.

Se puede concluir que los procesos de refrigeración y congelación, utilizados en el presente estudio generaron un alto deterioro de la vitalidad. Sin embargo los valores obtenidos fueron similares a valores previamente reportados en la literatura (41). Los autores recomiendan la realización de nuevos estudios para establecer procesos de refrigeración que permitan obtener mejores resultados de vitalidad, ya que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un marcado aumento en la mortalidad cuando el semen es sometido a procesos de refrigeración además no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el control y las muestras sometidas a procesos de congelación utilizando glicerol al 4% y 6%.

Los mejores valores de motilidad se le atribuyen a concentraciones del 4% y el 6% de glicerol. Valores del 8 % de glicerol generaron un marcado deterioro en la movilidad. El presente estudio también permite concluir que los valores de motilidad fueron bajos para todos los tratamientos. Se sugiere la realización de nuevos estudios que se concentren en mejorar la calidad de esta variable, ya que para procesos de inseminación artificial, con semen congelado, exitosos se recomienda tener motilidades espermáticas de entre el 40% y el 50 % (8,26). Además algunos estudios reportan movilidades postdescongelacion de hasta el 70% (37). Sin embargo, es importante mencionar nuevamente, que se han obtenido preñeses exitosa utilizando semen congelado con motilidades espermáticas de 20% 30% (26).

Los autores atribuyen los resultados de motilidad obtenidos en el presente estudio a largos periodos de transporte desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, lo cual puede reducir las reservas metabólicas de los espermatozoides (8) haciéndolos mas susceptibles durante la refrigeración, congelación y descongelación. Otro factor que vale la pena mencionar es que se obtuvieron mejores resultados de movilidad al final del estudio, con lo cual se concluye que mejoro el manejo de las muestras a medida que los investigadores obtenían experiencia a lo largo del proyecto.

Finalmente se concluye que diferentes concentraciones de glicerol afectan los parámetros seminales. Sin embargo, en el presente estudio, no se encontraron diferencias entre las concentraciones del 4% y el 6%, pero concentraciones del 8% generaron un marcado deterioro de las características seminales. Adicionalmente se concluye que las concentraciones de glicerol utilizadas en este estudio no afectan las variables pH, morfología y concentración.

Es importante tener en cuenta que factores como el transporte, la maquinaria y la mano de obra tienen una importante influencia en los resultados obtenidos en el presente estudio, por lo tanto seria pertinente sugerir la realización de más estudios similares, minimizando la influencia de los factores previamente mencionados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Olivera, M; Gobello, C. (2005). *El libro latinoamericano de reproducción canina y felina* (segunda edición). Medellín: Biogenesis. Revisado, Diciembre
2. Cunningham, JG. 2003. Fisiología veterinaria. Mexico: Editorial Mc Graw-Interamericana . Tercera edición;
3. Felman EC; Nelson RW. 2004. Canine and feline endocrinology and reproduction. EEUU: Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Tercera edición;
4. Sanchez RA; Cartagena PA; Berland OM. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. Rev Inv Vet 2006; 17 (1): 1 – 7 (Revisión, 16 de mayo de 2007)
5. Stornelli MA; De la Sota RL. Fertilidad y supervivencia del semen criopreservado. Analecta Veterinaria Facultad de ciencias veterinarias Universidad Nacional de la Plata 2006; 25 (2) : 29 – 38 (Revisión, 16 de mayo de 2007)
6. Bohorquez CR; De Ondiz A; Palomares R; Gallardo Fanny. Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia 2005; (1): 1-11 (Revisión, 24 de julio de 2007)

7. Stornelli MA; De La Sota RL. Congelación de semen canino. ISSN Facultad de ciencias veterinarias Universidad Nacional de la Plata 2006; (1): 10-13 (Revisión, 24 de julio de 2007)
8. Rodriguez SA; Soares CR; Machado Da Silva LD. Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria 2002; 9 (1): 25 – 28 (Revisión, 16 de mayo de 2007)
9. Hori Tatsuya; Odaka Sanae; et al. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. J. Vet. Med. Sci 2006; 68 (10): 1055 – 1061 (Revision 4 de abril de 2007)
10. Silva AR; et al. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. Theriogenology 2003; 59: 821 – 829 (Revisión, 24 de julio de 2007)
11. Silva AR; et al. Comparation between different dilution rates on canine semen freezing using Tris- buffer with the addition of egg-yolk and glycerol. Arq. Bras. Met.Vet. Zootec 2005; 57 (6): 764- 771. (Revisión, 24 de julio de 2007)
12. Gobello Cristina. 2006. Actualizacion en biotecnologia reproductiva canina. Disponible en línea URL: (Revisión, 16 de mayo de 2007)
www.unlpam.edu.ar

- 13.** Cotrino BV; Espindola AE. 2007. Encuesta Serológica sobre *Brucella canis* en Pacientes Atendidos en la Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la universidad Nacional De Colombia. Disponible en linea URL: (Revision 4 de abril de 2007)
www.lmvltda.com/cms/index
- 14.** Banco de semen canino. 2008. hospital veterinario-retiro Cryocel. Semen congelado. Disponible en linea URL: (Revision 4 de abril de 2007)
www.cryocel.com
- 15.** Gobello Cristina; Wanke MM. 2005. Reproducción en caninos y felinos domésticos. Argentina: editorial inter-medica S. A. primera edicion. 15: 27-31
- 16.** Shin SJ; Carmichael L. 2007. Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. Estados Unidos: International Veterinary Information Service. Disponible en linea URL: Document No. A0101.1199 (Revisión, 18 de febrero de 2008)
www.ivis.org.
- 17.** Johnson C. Current concepts on infertility in the dog. *Waltama focus* 2006; 58 (2): 7-12. (Revisión, 29 de agosto de 2007)
- 18.** Fontbonne A; Badinand F. Studies on dog freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing 1993; 47: 531-2. (Revision, 18 de febrero de 2008)

- 19.** Mathews CK; Ahern KG; et al. 2003. Bioquímica tercera edición. España: editorial Addison Wesley. Tercera edición. 613-615.
- 20.** Savignone CA; Stornelli MC. 2006. Efecto de la concentración de trealosa que no modifique la osmolaridad del diluyente TRIS base sobre la supervivencia espermática pos descongelación del semen canino. Argentina: Décimo congreso argentino de ciencias morfológicas FCV UNICEN. 11-16. (Revisión 4 de abril de 2007)
- 21.** Hafez B; Hafez ES. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. México: Mc Graw Hill. Séptima edición. 375-386.
- 22.** UrregoRodrigo; Pareja A; et al. El ensayo cometa una técnica para evaluar genotoxicidad en ADN de oocitos bovinos. Rev col ciens pec 2005; 17(3): 222-227. (Revisión 4 de abril de 2007)
- 23.** Orosco PGE. 2006. Evaluación de los crioprotectores glicerol, etilenglicol, dimetilformamida en la criopreservación de semen canino. Colombia: Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín. 38-53. (Revisión, 18 de febrero de 2008)
- 24.** Pérez AO. 2005. Efectos del protocolo de congelación sobre la viabilidad y la reacción acrosomal postdescongelamiento en semen canino. Colombia: Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín. 42-51. (Revisión 4 de abril de 2007)

- 25.** Eilts BE. Theoretical aspects of canine semen criopreservation. *Theriogelogy* 2005; 64: 692 – 697. (Revision 4 de abril de 2007)
- 26.** Soares Cardoso RC; et al. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogelogy* 2003; 59: 743 – 751. (Revision 9 de enero de 2008)
- 27.** Silva AR; et al. Canine semen's freeze with different concentrations of egg yolk and glycerol in tris and coconut water extenders. *Ciencia Rural* 2000; 30:1021-5. (Revision 15 de febrero de 2007)
- 28.** Ravaszova O; et al. A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. *Folia Veterinaria* 1996; 40:95-9. (Revision, 15 de febrero de 2007)
- 29.** Silva AR; et al. Quality of canine semen submitted to the single or fractionated glicerol addition during the freezing process. *Theriogelogy* 2003; 59: 821-829. (Revision 6 de marzo de 2008)
- 30.** Fontbonne A; Badinand F. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil* 1993; 47:531-2 (Revisión, 28 de julio de 2007)
- 31.** Ivanova-Kicheva MG; Bovadob ND; Somlev B. Criopreservation Of canine semen in pellets and in 5 ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology* 1997; 48: 1343-1349 (Revisión, 7 de septiembre de 2008)

- 32.** Peña AI; Barrio F; Quintela LA; Herradón PG. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* 1998; 50: 163-174 (Revisión, 29 de agosto de 2007)
- 33.** Olar TT; Bowen RA; Pickett BW. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 1999; 31: 451-461 (Revision 6 de marzo de 2008)
- 34.** Fontbonne A; Badinand F. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil.* 1993; 47: 531-532 (Revisión, 7 de septiembre de 2008)
- 35.** Olar TT. Cryopreservation of dog spermatozoa. PhD thesis, Colorado State University, 1984. (Revisión, 28 de julio de 2007)
- 36.** Smith FO. Update on freezing canine semen. In: Kirk R.W. (Ed) *Current veterinary therapy, small animal practice*, vol 9. Philadelphia: WB Saunders, 1986; 1243-1248
- 37.** Strom B; Rota A; Linder-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 48: 247-56 (Revisión, 29 de agosto de 2007)
- 38.** Silva AR, De Cássia Soares Cardoso R; Uchoa DC; Macgado De Silva LD. Effect of tris-buffer, Egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The veterinary journal* 2002; 164: 244-246 (Revisión, 28 de julio de 2007)
- 39.** Johnson SD; Kustritz MVR; Olson PNS. *Canine and feline theriogenology.* (2001). Philadelphia: WB Saunders Company. (Revision 6 de marzo de 2008)

40. Fastard W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal reproduction science* 1996. 42: 251-260 (Revisión, 29 de agosto de 2007)
41. GCW; Ponzio P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 1995. 46: 165-171 (Revisión, 7 de septiembre de 2008)
42. Minter LJ, De Liberto TJ. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology* 2005. 64: 1898-1912 (Revisión, 28 de julio de 2007)
43. Rota A; Strom B; Linde-Forsberg. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 1995. 44: 885-900 (Revision 6 de marzo de 2008)

13. ANEXOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos reportados en el formato de evaluación seminal de la página 47 del presente trabajo:

Nombre del perro: Aquiles

Edad: 4 años Peso: 24 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		x	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.8	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	16	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	90	X		70% o más
Formas normales (%)	92	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	2	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	6	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	423	X		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Aquiles

Edad: 4 años Peso: 24 kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.0		X	6.3 a 7.0
Vitalidad	18	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	30		X	70% o más
Formas normales (%)	77	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	8	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	15	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	169		X	200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Aquiles

Edad: 4 años Peso: 24 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	22		X	20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	28		X	70% o más
Formas normales (%)	78	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	4	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	18	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	168		X	200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Aquiles

Edad: 4 años Peso: 24 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	30		X	20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	22		X	70% o más
Formas normales (%)	71	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	10	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	19	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	196		X	200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Aquiles

Edad: 4 años Peso: 24 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.8	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	43		X	20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	56		X	70% o más
Formas normales (%)	79	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	6	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	15	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	234	X		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Choco

Edad: 2.5 años Peso: 22 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	4.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	19	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	85	X		70% o más
Formas normales (%)	81	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	7	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	12	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	253	X		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Choco

Edad: 2.5 años Peso: 22 kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	4.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	24		X	20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	25		X	70% o más
Formas normales (%)	77	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	9	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	14	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	146		X	200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Choco

Edad: 2.5 años Peso: 22 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	4.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	19	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	18		X	70% o más
Formas normales (%)	73	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	11		X	Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	16	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	62		X	200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Choco

Edad: 2.5 años Peso: 22 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	4.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	30		X	20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	21		X	70% o más
Formas normales (%)	77	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	12		X	Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	11	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	92		X	200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Choco

Edad: 2.5 años Peso: 22 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	4.0		X	2,5-3,0 ml
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.0		X	6.3 a 7.0
Vitalidad	35		X	20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	40		X	70% o más
Formas normales (%)	78	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	7	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	15	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	143		X	200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono San Diego (MIROCAN)

Edad: 4 años Peso: 21 Kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones: 9 pajillas por tratamiento. Total pajillas: 36.

Vi: 1.0 ml

Vf: 3.8 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.0		x	2.5-3.0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	29	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	38	x		70% o más
Formas normales (%)	89	x		70% o más
Anomalías primarias (%)	5	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	6	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	73	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono San Diego (MIROCAN)

Edad: 4 años Peso: 21 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones: 9 pajillas por tratamiento. Total pajillas: 36.

Vi: 1.0 ml

Vf: 3.8 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.0		x	2.5-3.0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	34	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	25	x		70% o más
Formas normales (%)	77	x		70% o más
Anomalías primarias (%)	11	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	12	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	84	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono San Diego (MIROCAN)

Edad: 4 años Peso: 21 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones: 9 pajillas por tratamiento. Total pajillas: 36.

Vi: 1.0 ml

Vf: 3.8 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.0		x	2.5-3.0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	30	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	8	x		70% o más
Formas normales (%)	82	x		70% o más
Anomalías primarias (%)	8	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	10	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	83	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono San Diego (MIROCAN)

Edad: 4 años Peso: 21 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones: 9 pajillas por tratamiento. Total pajillas: 36.

Vi: 1.0 ml

Vf: 3.8 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.0		x	2.5-3.0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	21	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	60	x		70% o más
Formas normales (%)	85	x		70% o más
Anomalías primarias (%)	6	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	9	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	160	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Ñeco (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 29 kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VI: 2.5 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2.5-3.0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	30	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	57	x		70% o más
Formas normales (%)	73	x		70% o más
Anomalías primarias (%)	10	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	17	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	75	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Ñeco (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 29 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VI: 1.5 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2.5-3.0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	38	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	38	x		70% o más
Formas normales (%)	72	x		70% o más
Anomalías primarias (%)	10	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	18	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	87	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Ñeco (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 29 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones:

VI: 1.5 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2.5-3.0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	44	X		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	28	x		70% o más
Formas normales (%)	71	x		70% o más
Anomalías primarias (%)	10	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	19	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	68	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Ñeco (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 29 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VI: 1.5 ml (dilución 1:1)

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	23			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	54			70% o más
Formas normales (%)	73			70% o más
Anomalías primarias (%)	12			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	15			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	210			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Oscar

Edad:6 años Peso: 33 Kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.2	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	33			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	29			70% o más
Formas normales (%)	74			70% o más
Anomalías primarias (%)	7			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	19			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	100			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Oscar

Edad: 6 años Peso: 33 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.2	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	31			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	31			70% o más
Formas normales (%)	73			70% o más
Anomalías primarias (%)	3			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	24			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	112			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Oscar

Edad: 6 años Peso: 33 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	44			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	15			70% o más
Formas normales (%)	69			70% o más
Anomalías primarias (%)	8			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	23			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	89			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Oscar

Edad: 6 años Peso: 33 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	14			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	40			70% o más
Formas normales (%)	84			70% o más
Anomalías primarias (%)	12			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	4			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	213			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Raul (UNIMIN)

Edad: 5.5 años Peso: 28,4 kg

Tratamiento: 1. **Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	40			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	35			70% o más
Formas normales (%)	81			70% o más
Anomalías primarias (%)	9			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	10			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	174			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Raul (UNIMIN)

Edad: 5.5 años Peso: 28,4 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.8	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	27			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	30			70% o más
Formas normales (%)	79			70% o más
Anomalías primarias (%)	12			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	9			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	153			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Raul (UNIMIN)

Edad: 5.5 años Peso: 28,4 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	36			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	24			70% o más
Formas normales (%)	85			70% o más
Anomalías primarias (%)	10			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	5			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	182			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Raul (UNIMIN)

Edad: 5.5 años Peso: 28,4 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	37			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	40			70% o más
Formas normales (%)	87			70% o más
Anomalías primarias (%)	7			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	6			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	167			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Rufo

Edad: 2 Peso: 23 Kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	40			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	20			70% o más
Formas normales (%)	76			70% o más
Anomalías primarias (%)	10			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	14			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	86			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Rufo

Edad: 2 Peso: 23 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	35			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	18			70% o más
Formas normales (%)	76			70% o más
Anomalías primarias (%)	9			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	15			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	77			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Rufo

Edad: 2 Peso: 23 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.3	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	37			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	15			70% o más
Formas normales (%)	72			70% o más
Anomalías primarias (%)	15			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	13			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	80			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Rufo

Edad: 2 Peso: 23 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	27			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	35			70% o más
Formas normales (%)	56			70% o más
Anomalías primarias (%)	18			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	26			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	180			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Simon (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 31 kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VI: 3 ml (dilución 1:1)

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3.0		X	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	31			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	35			70% o más
Formas normales (%)	89			70% o más
Anomalías primarias (%)	8			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	3			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	85			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Simon (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 31 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones: Numero de pajillas a congelar: 6 por tratamiento (total pajillas 24)

VI: 3 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	39			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	11			70% o más
Formas normales (%)	81			70% o más
Anomalías primarias (%)	11			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	8			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	100			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Simon (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 31 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones:

3 ml (dilución 1:1)

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	56			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	17			70% o más
Formas normales (%)	78			70% o más
Anomalías primarias (%)	9			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	13			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	94			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Simon (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 31 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VI: 3 ml (dilución 1:1)

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	3.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	24			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	45			70% o más
Formas normales (%)	79			70% o más
Anomalías primarias (%)	7			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	14			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	160			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Zulu (UNIMIN)

Edad: 4 años Peso: 27 kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	35			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	19			70% o más
Formas normales (%)	78			70% o más
Anomalías primarias (%)	11			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	11			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	221			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Zulu (UNIMIN)

Edad: 4 años Peso: 27 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	18			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	10			70% o más
Formas normales (%)	79			70% o más
Anomalías primarias (%)	11			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	10			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	235			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Zulu (UNIMIN)

Edad: 4 años Peso: 27 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	47			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	13			70% o más
Formas normales (%)	69			70% o más
Anomalías primarias (%)	18			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	13			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	215			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Zulu (UNIMIN)

Edad: 4 años Peso: 27 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.2	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	35			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	50			70% o más
Formas normales (%)	88			70% o más
Anomalías primarias (%)	7			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	5			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	204			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Dante (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 27,5 Kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.6		x	2,5-3,0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	27			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	22			70% o más
Formas normales (%)	79			70% o más
Anomalías primarias (%)	5			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	16			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	153			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Dante (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 27,5 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones: Numero de pajillas a congelar: 4 por tratamiento (total pajillas 16)

VI: 2.6 ml (dilución 1:1)

Vf: 4 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.6		x	2,5-3,0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	25			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	26			70% o más
Formas normales (%)	83			70% o más
Anomalías primarias (%)	4			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	13			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	148			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Dante (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 27,5 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones: Numero de pajillas a congelar: 4 por tratamiento (total pajillas 16)

VI: 2.6 ml (dilución 1:1)

Vf: 4 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.6		x	2,5-3,0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	31			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	20			70% o más
Formas normales (%)	84			70% o más
Anomalías primarias (%)	8			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	8			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	143			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Dante (MIROCAN)

Edad: 3 años Peso: 27,5 Kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.6		x	2,5-3,0mL
Color	NA	X		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	X		6.3 a 7.0
Vitalidad	17			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	53			70% o más
Formas normales (%)	85			70% o más
Anomalías primarias (%)	8			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	7			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	205			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 30.2 kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones: Numero de pajillas a congelar: 6 por tratamiento (total pajillas 24)

Vi: 2 ml (dilución 1:1)

Vf: 10.12 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	28	x		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad progresiva (%)	42			70% o más
Formas normales (%)	76	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	9	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	15	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	82			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 30.2 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones: Numero de pajillas a congelar: 6 por tratamiento (total pajillas 24)

Vi: 2 ml (dilución 1:1)

Vf: 10.12 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	29	x		20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	35	x		70% o más
Formas normales (%)	74	X		70% o más
Anomalías primarias (%)	10	X		Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	16	X		Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	72	x		200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 30.2 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones: Numero de pajillas a congelar: 6 por tratamiento (total pajillas 24)

VI: 2 ml (dilución 1:1)

Vf: 10.12 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	7,0	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	41			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	20			70% o más
Formas normales (%)	76			70% o más
Anomalías primarias (%)	13			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	11			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	55			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Mono (MIROCAN)

Edad: 6 años Peso: 30.2 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones: Numero de pajillas a congelar: 6 por tratamiento (total pajillas 24)

VI: 2 ml (dilución 1:1)

Vf: 10.12 ml

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	2.0		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6,5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	30			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	70			70% o más
Formas normales (%)	76			70% o más
Anomalías primarias (%)	13			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	17			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	230			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

ucas

Edad: 4 años Peso: 25 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	17			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	80			70% o más
Formas normales (%)	73			70% o más
Anomalías primarias (%)	9			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	18			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	690			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Lucas

Edad: 4 años Peso: 25 kg

Tratamiento: **1. Glicerol 4%** 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	14			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	38			70% o más
Formas normales (%)	75			70% o más
Anomalías primarias (%)	11			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	14			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	121			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Lucas

Edad: 4 años Peso: 25 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% **2. Glicerol 6%** 3. Glicerol 8% 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	21			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	34			70% o más
Formas normales (%)	78			70% o más
Anomalías primarias (%)	9			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	13			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	95			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Lucas

Edad: 4 años Peso: 25 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% **3. Glicerol 8%** 4. Control

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6.5	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	34			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	28			70% o más
Formas normales (%)	70			70% o más
Anomalías primarias (%)	13			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	17			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	87			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica

Nombre del perro: Lucas

Edad: 4 años Peso: 25 kg

Tratamiento: 1. Glicerol 4% 2. Glicerol 6% 3. Glicerol 8% **4. Control**

Observaciones:

VARIABLE	VALOR	AN	A	REFERENCIA
Volumen (mL)	1.5		x	2,5-3,0mL
Color	NA	x		Blanco a opalescente y opaco
pH	6,8	x		6.3 a 7.0
Vitalidad	23			20 % de espermatozoides teñidos con eosina
Movilidad (%)	42			70% o más
Formas normales (%)	75			70% o más
Anomalías primarias (%)	16			Hasta 10%
Anomalías secundarias (%)	9			Hasta 20%
Concentración espermática (millones/mL)	143			200 o más

AN: Aparentemente normal, se encuentra dentro del valor de referencia

A: Anormal, esta por fuera del valor de referencia

NA: No aplica